

3-メチルブタナール生産性乳酸菌
を用いた発酵乳における
ナッツ臭の増強に関する研究

令和7年3月

弘前大学大学院地域共創科学研究科

産業創成科学専攻

食産業イノベーション研究領域

畜産物利用学研究室

23GC210

林崎菜月

<目次>

第一章 3-メチルブタナール生産性乳酸菌を用いた発酵乳における

ナッツ臭の増強に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P2

要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P2

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P3

第一節 AJ01 株の培養条件が 3-メチルブタナール生産に及ぼす影響・・・・・・・・ P5

材料および方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P5

結果および考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P9

第二節 ナッツ臭製造株である *Lactococcus cremoris* AJ01 における

3-メチルブタナール代謝経路についての研究・・・・・・・・ P16

材料および方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P16

結果および考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P21

まとめ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P26

参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P29

第二章 グルコース添加カッテージチーズにおける食中毒細菌の挙動・・・・・・・・ P33

要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P33

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P34

材料および方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P35

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P37

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P37

結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P38

参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P39

図表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ P41

第一章 3-メチルブタナール生産性乳酸菌を用いた発酵乳におけるナッツ臭の増強に関する研究

要約

背景と目的

チーズの風味は購入基準の一つであり、その形成には原料、微生物叢、熟成条件、成分などが影響を与える。熟成の進んだチェダーチーズでみられるナッツ臭は一部の消費者に好まれ、ナッツ臭の原因の一つにアルデヒドである 3-メチルブタナールがある。ナッツ臭の生産には 1 年以上の熟成が必要であり、コストの増加が課題である。そこで、3-メチルブタナールを生産する乳酸菌を用いれば、熟成初期からナッツ臭のあるチーズを製造できる可能性がある。

本研究では、チーズの熟成期間短縮に寄与するために 3-メチルブタナール生産性乳酸菌 *Lactococcus cremoris* AJ01 を用い、3-メチルブタナールの生産が増加する発酵条件の調査および AJ01 株における 3-メチルブタナール代謝経路を明らかにすることを目的とした。

方法

発酵条件の最適化

AJ01 株を用い、発酵条件が 3-メチルブタナール生産量に与える影響を調査した。培地中へのロイシン、NaCl の添加、培養時間および温度が生産量に及ぼす影響を調べ、3-メチルブタナールの生産量が増加する条件を探索した。

発酵乳製造と保存条件の検討

発酵条件の調査で得られた結果をもとに AJ01 株を用いて発酵乳を製造し、発酵中および保存中における 3-メチルブタナール濃度の推移を分析した。

3-メチルブタナールの代謝経路解析

AJ01 株の 3-メチルブタナール生産に関与する代謝経路を明らかにするため、酵素 (α -ケト酸デカルボキシラーゼおよびピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体) をコードする遺伝子を PCR 法で確認し、さらに、酵素活性を測定した。

結果

AJ01 株の培養条件の検討を行い、培地に 100 mg/L のロイシンを添加し 20°C で 18 時間培養した場合に最も高濃度である 7.38 mg/L を達成した。AJ01 株を用いた発酵乳の製造では、発酵乳の保存試験中は常にチーズ中の 3-メチルブタナールの識別閾値である 0.15 mg/L を超える濃度が検出され、AJ01 株は熟成初期にナッツ臭のするチーズを製造するのにふさわしい菌株であることが示唆された。また、原料乳に 100 mg/L のロイシンを添加することで発酵乳中の 3-メチルブタナール濃度が増加し、さらに、保存中の 3-メチルブタナール濃度が高いレベルで維持されることが分かった。代謝経路解析の結果、AJ01 株は直接経路を触媒する酵素である α -ケト酸デカルボキシラーゼを持たず、間接経路を触媒するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体を持つ株であることが分かった。

緒言

チーズの熟成とは、凝乳後の固形分を組織に含まれる乳酸菌や凝乳酵素と共に、チーズの種類に応じた温度と湿度に保った環境で長期間保蔵することで、複雑な酵素反応を起こさせる操作のことである（齋藤 2010）。熟成を経たチーズは独特の風味、味覚、滑らかな組織と食感を獲得するようになる（齋藤 2010）。熟成で獲得する要素の中でも風味は消費者がチーズを購入する際の重要な判断基準の一つであり、原料、微生物叢、熟成条件、成分などに基づいて生成される。同じ種類のチーズでも全く同じ風味ではないことが知られている（Dunn と Lindsay 1985 ; Young ら 2004）。チェダーチーズの場合は熟成が進むと、硫黄臭、出汁臭、ナッツ臭が特徴的な風味と報告されており（Drake ら 2001）、こうした熟成チーズ特有の風味が一部の消費者に好まれることが示されている（Young ら 2004 ; Zhang ら 2011）。ナッツ臭に寄与する芳香性物質として、ストレッカーアルデヒドである 2-メチルプロパナール、2-メチルブタナールおよび 3-メチルブタナールがある（Avsar ら 2004）。2-メチルプロパナール、2-メチルブタナールおよび 3-メチルブタナールは、それぞれ分岐鎖アミノ酸であるバリン、イソロイシンおよびロイシンから生成されるアルデヒドである。チーズの産地や製造方法によってチーズ中のナッツ臭の有無に違いが見られる（Avsar ら 2004）が、ナッツ臭のするチェダーチーズのほとんどは短い熟成期間では臭いが無く、1 年程度熟成するとナッツ臭がし始めることが知られており（Avsar ら 2004 ; Jo ら 2018）、上記のアミノ酸がストレッカーアルデヒドに変換されるには、約 1 年といった長期間を要する可能性が示唆される。そのため、熟成期間を短縮しつつナッツ臭を発現させる方法の研究が進められており、このような研究はチーズ製造業者にとって経済的な利点をもたらすと考えられる。

ナッツ臭を生産する乳酸菌の報告があり（Jackson と Morgan 1954 ; Narvhus ら 1998 ; Sheldon ら 1971）、その菌株を使用してチーズを製造すると、熟成初期にナッツ臭が発現することが示されている（Whetstone ら 2006）。このことから、ナッツ臭を生産する乳酸菌を用いることで、若いチーズでもナッツ臭を持つものを製造でき、熟成期間の短縮に寄与する可能性が示唆された。そこで、ストレッカーアルデヒドを生産する菌株の探索や、その代謝に関わる酵素の調査、培養条件が 3-メチルブタナール生産量に及ぼす影響を調べた論文が存在し（Ayad ら 1999 ; Marales ら 2003 ; Smit ら 2004a ; Palencia ら 2006 ; Amarita ら 2006 ; Brandsma ら 2008 ; Afzal ら 2013）、ロイシンの添加（Meng ら 2021）や NaCl の添加（Brandsma ら 2022）が乳酸菌の 3-メチルブタナール生産を増強するという報告もある。しかしながら、ナッツ臭を生産すると確認されている菌株は少なく、乳酸菌による 3-メチルブタナール代謝についてよくわかっていないのが現状である。

本研究室が保有する *L. cremoris* AJ01 は青森県の酪農場で分離された乳酸菌であり、チーズのナッツ臭に寄与するとされるストレッカーアルデヒドの一つである 3-メチルブタナールを生産することが分かった。そこで、本菌株を使用して乳酸菌の 3-メチルブタナール生産が増強する培養条件について調べた。また、本菌株を使用した発酵乳を製造し、保存

中の 3-メチルブタナール量の推移についても調べた。

3-メチルブタナールの生成には、以下の 2 つの経路が報告されている (Afzal ら 2012)。はじめに、ロイシンがアミノトランスフェラーゼによってアミノ基を α -ケトグルタル酸に供与し (Ziadi ら 2010) α -ケトイソカプロン酸に変換される (図 1)。①直接経路では、 α -ケトイソカプロン酸が α -ケト酸デカルボキシラーゼにより 3-メチルブタナールに代謝される。②間接経路では、 α -ケトイソカプロン酸が α -ケト酸デヒドロゲナーゼによってイソバレリル-CoA に変換され、さらに代謝を経て 3-メチルブタナールが生成される。そして 3-メチルブタナールはその後 3-メチルブタノールまたは 3-メチルブタン酸に代謝される。

3-メチルブタナールを生産する微生物として *Propionibacterium freudenreichii*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus carnosus/xylosus* が報告されており (Masson ら 1999 ; Thierry ら 2002 ; Perterson ら 2004 ; Helink ら 2004 ; Afzal ら 2012), 菌種や菌株間で 3-メチルブタナールの生産量や代謝経路, 働く酵素の種類に違いがあることが知られている (Ayad ら 1999 ; Smit ら 2004b ; Afzal ら 2012 ; Chen ら 2021)。しかしながら, 3-メチルブタナールの代謝経路と生産量の関係について調べた論文は少なく, よくわかっていない。そこで, 本研究では AJ01 株を用い, 3-メチルブタナールの生産量を調べ, その生産量を増加させる培養条件を調査するとともに, その代謝経路を解析することを目的とした。

第一節では, AJ01 株を還元脱脂乳で培養し, 3-メチルブタナールの生産量を増加させる発酵条件を検討した。また, 発酵乳を製造し, 発酵乳中の 3-メチルブタナール濃度および保存中の推移についても調べた。

第二節では AJ01 株が持つ 3-メチルブタナール生産の直接経路および間接経路に関与する酵素遺伝子を PCR 法を用いて調べ, つづいて, それぞれの酵素活性を測定した。

第一節 AJ01 株の培養条件が 3-メチルブタナール生産に及ぼす影響

材料および方法

<使用した乳酸菌および乳酸菌の賦活化>

本研究室が保有する *Lactococcus cremoris* AJ01 は青森県の酪農場で分離された菌株である。

滅菌還元脱脂乳 (10%, (w/v)) 中で冷凍保存していた AJ01 株を解凍し, 5 mL の TYLG 培地に 50 μ L 接種し, 30°C で培養した。本研究のすべての実験において, TYLG 培地で 3 回以上継代し, 賦活化したものを使用した。TYLG 培地は水 1000 mL に対し, トリプトン 10 g, 酵母エキス 5 g, グルコース 5 g, ラクトース 5 g, Tween80 1 g, L-システイン塩酸塩 0.1 g を加え, 5 mL ずつ試験管に分注したのち, 高圧蒸気滅菌 (121°C, 15 分) した。高圧蒸気滅菌する前に pH を 6.8 ± 0.2 に調整した。

<ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) による 3-メチルブタナールの定性>

GC/MS 条件

加熱脱着部 (TDU2, GERSTEL, Germany) は 25°C 1min \rightarrow 60°C/min 昇温 \rightarrow 230°C 4min。クライオフォーカス部 (CIS4, GERSTEL, Germany) は 10°C 0.5min \rightarrow 12°C/sec 昇温 \rightarrow 260°C 10min であった。GC/MS (Agilent 7890A / 5973), カラムは HP-INNOWAX 60m \times 0.25mm \times 0.25 μ m, キャリアガスはヘリウム 1.0ml/min でコンスタントフローした。注入は TDU2 splitless, オープン温度は 40°C 5min \rightarrow 3°C/min 昇温 \rightarrow 240°C 15min であった。質量分析は Scan (m/z 30-350) であった。

解析法

得られたクロマトグラムに対して, デコンボリューションによるピーク同定と化合物推定を行った。化合物推定に用いたデータベースは NIST.14, スコア 70 以上で行った。ピーク面積 50000 ポイント以上のものを検出した。

AJ01 株発酵乳中の 3-メチルブタナールの定性

サンプル

サンプルは滅菌還元脱脂乳 (10%, w/v) 5 mL に AJ01 株を 1% 量接種し, 30°C で 18 時間発酵させた AJ01 株発酵乳および滅菌還元脱脂乳 (10%, w/v) であった。

分析法

試料 10ml, NaCl 2 g をガラスバイアルに入れ, 吸着剤である, ポリジメチルシロキサン (PDMS) が塗布された攪拌子 (Twister, GERSTEL, Germany) を入れ, キャップを閉めた。攪拌子を用いて, 室温, 800rpm, 60~90 分間攪拌した。攪拌の終わった Twister を超純水でリンスし, キムワイプで十分に水分を拭き取った後, ガラスチューブにセットし, GC/MS で分析を行った。

<高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による 3-メチルブタナールの定量方法の決定>

HPLC 条件

カラムは Mightysil RP-18 GP を使用した。移動相は 60% アセトニトリル水溶液 (v/v)

を使用した。カラム温度は 38°C，流速 1.0 mL/min，検出波長は 365 nm であった。また，サンプルループは 20 μ L であった。

検量線の作成

3-メチルブタナールの標品を段階希釈し，検量線用試料溶液とした。すなわち，3-メチルブタナールの標品を 60%アセトニトリル水溶液 (v/v) で希釈し，0.1, 0.5, 1 および 5 mg/L の 3-メチルブタナール溶液を作成した。それぞれの濃度の検量線用試料溶液と 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) 溶液 (DNPH 20 mg を蒸留水：リン酸：アセトニトリル=10 mL：4 mL：2 mL の混合液に溶解し，蒸留水：リン酸：アセトニトリル=5：2：1 の混合液を用いて 10 倍希釈した。遮光して冷蔵庫で保存) を 10：1 で混合し，アルミホイルで遮光処理をした 20°C の恒温器内で 40 分以上誘導体化させたのち HPLC で測定した。

AJ01 株発酵乳中の 3-メチルブタナール測定方法の決定

滅菌還元脱脂乳に，賦活化した AJ01 株を 1%量接種し，揮発性物質の飛散を防ぐために試験管に滅菌シリコン栓で蓋をした後 30°C で 18 時間発酵させた。18 時間発酵させた発酵乳 1 g を試験管に測り取り，アセトニトリル水溶液 (80%，v/v) で 3 倍希釈したのちボルテックスで攪拌し，1000 g \times 5 分で遠心分離した。遠心分離後の上澄み液をポアサイズ 0.22 μ m のフィルターで新しい試験管にろ過した。ろ液を HPLC 用試料溶液とした。HPLC 用試料溶液と DNPH 溶液を 10：1 で混合し，アルミホイルで遮光処理をした 20°C の恒温器内で 40 分以上誘導体化させたのち HPLC 分析に供した。

<培地へのロイシンの添加が AJ01 株の 3-メチルブタナール生産に及ぼす影響>

ロイシン添加滅菌還元脱脂乳の作成

ロイシン水溶液を 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 および 5000 mg/L (w/v) の濃度で調製した。その後，それぞれの濃度のロイシン水溶液に脱脂乳 (10%，w/v) を溶解し，ロイシン添加還元脱脂乳とした。ロイシン添加還元脱脂乳を 5 mL ずつ試験管に分注し 105°C で 5 分間高圧蒸気滅菌したものをロイシン添加滅菌還元脱脂乳とした。

ロイシンを添加した AJ01 株発酵乳中の 3-メチルブタナールの定量

ロイシン添加滅菌還元脱脂乳 (5 mL) に，賦活化した AJ01 株を 1%量接種し，試験管に滅菌シリコン栓で蓋をした後 30°C で 0 および 18 時間発酵させたものを測定に使用した。発酵乳中の 3-メチルブタナール濃度は上述した方法で測定した。本研究においては，ロイシンを添加した滅菌還元脱脂乳中の 3-メチルブタナール量をブランクとし，18 時間発酵させた発酵乳の 3-メチルブタナール量からブランクを差し引いた値を AJ01 株が生産した 3-メチルブタナール量とした。3-メチルブタナール濃度の測定はそれぞれの濃度のロイシン添加滅菌還元脱脂乳ごとに 3 回行った。結果は 3 回の平均 \pm 標準偏差を示した。

滴定酸度の測定

ロイシン添加滅菌還元脱脂乳 (5 mL) に，賦活化した AJ01 株を滅菌生理食塩水で 10² 倍希釈したのち，希釈液を 1%量接種した。その後，30°C で 0 および 18 時間発酵させたも

のを測定に使用した。それぞれの発酵時間で、発酵乳を三角フラスコに約 1.0 g とり、蒸留水を適量加えた。よく攪拌し、フェノールフタレイン溶液（フェノールフタレイン 0.5 g を、70%エタノール（v/v）50 mL に溶解したもの）を数滴加えた。水酸化ナトリウム溶液（0.1 M, ファクター0.99）で滴定し、微紅色が 30 秒間消えない点を終点とし、滴定酸度を以下の式で算出した。滴定酸度の測定はそれぞれの濃度のロイシン添加滅菌還元脱脂乳ごとに 3 回行った。結果は 3 回の平均±標準偏差を示した。

滴定酸度（乳酸%）=（0.1 M NaOH 滴定量（mL）×ファクター）×0.009÷試料の重量×100

生菌数測定

ロイシン添加滅菌還元脱脂乳（5 mL）に、賦活化した AJ01 株を滅菌生理食塩水で 10^3 倍希釈したものを 1%量接種した。その後、30℃で 0 および 18 時間発酵させたものを測定に使用した。それぞれの発酵時間で発酵乳を滅菌生理食塩水で段階希釈し、希釈液 100 μ L を BCP 加 TYLG 寒天培地にそれぞれ均一に塗布し、30℃で 3 日間培養した後生菌数を測定した。同一段階希釈の試料に対し寒天培地を 2 枚用意し、結果はその 2 枚の平均±標準偏差を示した。生菌数の測定はそれぞれの濃度のロイシン添加滅菌還元脱脂乳ごとに 3 回行った。BCP 加 TYLG 寒天培地は水 1000 mL に対し、トリプトン 10 g, 酵母エキス 5 g, グルコース 5 g, ラクトース 5 g, Tween80 1 g, L-システイン塩酸塩 0.1 g, 寒天 15 g およびブロモクレゾールパープル（BCP）溶液を適量加え、高圧蒸気滅菌（121℃, 15 分）した。溶液は三角フラスコで調整し、BCP 溶液を加える前に pH を 6.8 ± 0.2 に調整した。高圧蒸気滅菌した後、攪拌しつつ 50℃まで冷まし、滅菌済みシャーレに無菌的に分注し、固化させた。

<発酵温度が AJ01 株の 3-メチルブタナール生産に及ぼす影響>

発酵温度が AJ01 株の 3-メチルブタナール生産に及ぼす影響を調べた。すなわち、ロイシンを添加した AJ01 株発酵乳を 10℃, 20℃および 30℃で 48 時間発酵させた場合の 3-メチルブタナール濃度を経時的に測定した。

ロイシンを 100 mg/L 添加した 5 mL の滅菌還元脱脂乳に、賦活化した AJ01 株を 1%量接種し、揮発性物質の飛散を防ぐためにアルミキャップとパラフィルムを用いて試験管に封をし、10℃, 20℃および 30℃で発酵させた。発酵中の 3-メチルブタナール濃度および滴定酸度は 48 時間目まで経時的に測定した。3-メチルブタナール濃度および滴定酸度は上述した方法で測定した。3-メチルブタナール濃度および滴定酸度は 3 回測定し結果は平均±標準偏差を示した。

<NaCl の添加と、その場合のロイシンの有無が AJ01 株の 3-メチルブタナール生産に及ぼす影響>

NaCl の添加とその場合のロイシンの有無が AJ01 株の 3-メチルブタナール生産に及ぼす影響について調べた。すなわち、ロイシン添加および無添加 AJ01 株発酵乳中に NaCl を溶解した場合の AJ01 株発酵乳中の 3-メチルブタナール濃度を調べた。

蒸留水に 0, 2, 4 および 6% (w/v) の NaCl を溶解した NaCl 水溶液を調製した。それぞれの濃度の NaCl 水溶液にロイシン (100 mg/L) および脱脂乳 (10%, w/v) を溶解し、105°Cで 5 分間高圧蒸気滅菌を行った。このとき、ロイシンを添加しないロイシン無添加還元脱脂乳も調製した。滅菌後の還元脱脂乳に賦活化した AJ01 株を 1%量を接種し、アルミキャップとパラフィルムを用いて試験管に封をし、18 時間発酵後の 3-メチルブタナール濃度を測定した。滴定酸度と生菌数は発酵 0 時間目および 18 時間目に測定した。3-メチルブタナール濃度、滴定酸度および生菌数は 3 回測定し結果は平均±標準偏差を示した。

<発酵乳中の 3-メチルブタナールの保存性試験>

発酵乳を製造した後、保存した場合の 3-メチルブタナールの残存を確認するために、30°Cで 24 時間発酵させ発酵乳を製造し、その後 8°Cで 5 日間保存した場合の 3-メチルブタナール濃度を調べた。また、保存時に 3-メチルブタナールが減少することが予想されたため保存前の発酵乳へのロイシン水溶液の添加が発酵乳中の 3-メチルブタナール濃度に及ぼす影響についても調べた。

発酵乳中の 3-メチルブタナールの保存性試験

ロイシン無添加滅菌還元脱脂乳およびロイシンを 100 mg/L 添加した滅菌還元脱脂乳 (5 mL) に、賦活化した AJ01 株を 1%量接種し、アルミキャップとパラフィルムを用いて試験管に封をし、30°Cで 5 時間または 24 時間発酵させた。発酵後 8°Cで 5 日間保存した。その間 3-メチルブタナール濃度の測定を毎日行った。3-メチルブタナール濃度は 3 回測定し結果は平均±標準偏差を示した。

発酵後の発酵乳へのロイシン水溶液の添加が発酵乳中の 3-メチルブタナール濃度に及ぼす影響

適当量の蒸留水にロイシンを 0.01 g 溶解し、10 mL にメスアップし、1000 mg/L のロイシン水溶液を調製した。その後、105°Cで 5 分間高圧蒸気滅菌を行った。ロイシンを 100 mg/L 添加した 5 mL の滅菌還元脱脂乳に、賦活化した AJ01 株を 1%量接種し、アルミキャップとパラフィルムを用いて試験管に封をし、30°Cで 24 時間発酵させた。発酵後、調製した 1000 mg/L のロイシン水溶液を 50 μ L 添加し、ボルテックスで攪拌した。ロイシン水溶液添加後の試験管内のロイシン濃度は 100.04 mg/L (添加したロイシン量+発酵後に追加したロイシン量) であった。その後 8°Cに移動させ、5 日間保存した。その間毎日 3-メチルブタナール濃度の測定を行った。3-メチルブタナール濃度は 3 回測定し結果は平均±標準偏差を示した。

<統計処理>

培地へのロイシンの添加が AJ01 株の 3-メチルブタナール生産に及ぼす影響の調査では、ロイシン添加濃度の違いによって 3-メチルブタナール濃度、滴定酸度および生菌数の平均値に差があるか、一元配置分散分析を行い、その後、補正 Tukey の多重比較検定を行った ($p<0.05$)。統計処理には統計ソフト EZR Version 4.31 (Kanda 2013) を使用した。

NaCl の添加と、その場合のロイシンの有無が AJ01 株の 3-メチルブタナール生産に及ぼす影響の調査では、NaCl 添加濃度の違いによって 3-メチルブタナール濃度、滴定酸度および生菌数の平均値に差があるか、student の t 検定を行った ($p < 0.05$)。発酵乳中の 3-メチルブタナールの保存性試験では、原料乳へのロイシン添加の有無またはロイシン水溶液の追加の有無によって 3-メチルブタナール濃度の平均値に差があるか、student の t 検定を行った ($p < 0.05$)。統計処理には Microsoft Excel 2016 を使用した。

結果および考察

<ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) による 3-メチルブタナールの定性>

還元脱脂乳および AJ01 株発酵乳の GC/MS を行った (図 2)。還元脱脂乳では 3-メチルブタナールのピークが出ていないが、AJ01 株発酵乳では 3-メチルブタナールのピークが見られた。よって、AJ01 株が 3-メチルブタナールを生産していることが分かった。

<高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による 3-メチルブタナールの定量方法の決定>

3-メチルブタナールの標品および AJ01 株発酵乳を HPLC 分析に供した結果、3-メチルブタナールはおよそ 15 分に検出された (図 3)。3-メチルブタナール標品を希釈して検量線を作成した結果、 $R^2 = 0.999$ であった (図 4)。検量線の結果を用いて、発酵乳 1 g あたりの 3-メチルブタナール濃度は以下の式で算出した。

$$\begin{aligned} & \text{発酵乳 1 g あたりの 3-メチルブタナール濃度 (mg/L)} \\ &= [(HPLC \text{ のピーク面積}) - 14415.8055736283] \times 145027.3400563870 \times 3 \end{aligned}$$

<培地へのロイシンの添加が AJ01 株の 3-メチルブタナール生産に及ぼす影響>

ロイシンを 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 および 5000 mg/L 添加した滅菌還元脱脂乳で AJ01 株を培養した場合の 3-メチルブタナール生産量を測定した (図 5)。その結果、100 mg/L ~ 1000 mg/L の範囲のロイシン添加で最も高い 3-メチルブタナール濃度が検出された。また、100 mg/L ~ 5000 mg/L の範囲でロイシン添加量を増やしても AJ01 株の 3-メチルブタナール生産量は増加しないことが分かった。

ロイシン添加量が 0, 5 および 10 mg/L の場合の 3-メチルブタナール生産量は 1.17 ± 0.03 , 1.14 ± 0.08 および 1.52 ± 0.16 mg/L であり有意な差は見られなかった ($p < 0.05$)。ロイシン添加量が 50 mg/L の場合の 3-メチルブタナール生産量は 2.23 ± 0.16 mg/L であり、ロイシン無添加と比較して約 2 倍に増加した。ロイシン添加量が 100, 500 および 1000 mg/L の場合の 3-メチルブタナール生産量は 3.15 ± 0.15 , 2.98 ± 0.25 , 3.15 ± 0.24 mg/L であり、ロイシン無添加と比較して約 2.6 倍に増加した。ロイシン添加量が 5000 mg/L の場合の 3-メチルブタナール濃度はロイシン添加量が 100, 500 および 1000 mg/L の場合より低く 2.48 ± 0.34 mg/L であった。

ロイシンを 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 および 5000 mg/L 添加した滅菌還元脱脂乳で AJ01 株を培養した場合の滴定酸度を測定した (図 5)。その結果、100 mg/L より高い濃度のロイシンの添加は AJ01 株の生酸性を低下させた。ロイシン添加濃度に関わらず、0 時間目の滴定酸度は 0.11 ~ 0.14% であった。18 時間目の滴定酸度は、ロイシンを 0,

5, 10, 50, 100, 500, 1000 および 5000 mg/L 添加した場合 0.66, 0.65, 0.68, 0.63, 0.61, 0.58, 0.51 および 0.33%であった。ロイシンの添加量が増加するほど滴定酸度が低下する傾向がみられたが、ロイシンの添加量が 100 mg/L までの場合はロイシン無添加の場合と比較して差は無かった ($p < 0.05$)。ロイシンの添加量が 500 および 1000 mg/L になると 18 時間発酵後の乳の凝固が弱まり、5000 mg/L のときには凝乳が見られなかった。

ロイシンを 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 および 5000 mg/L 添加した滅菌還元脱脂乳で AJ01 株を培養した場合の生菌数を測定した (図 5)。その結果、ロイシンの添加量に関わらず生菌数に有意な差は見られなかった。0 時間目の生菌数はロイシン添加濃度に関わらず一定で 3.8~3.9 log cfu/g であった。18 時間発酵後の生菌数は、ロイシンを 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 および 5000 mg/L 添加した場合 9.5, 9.5, 9.5, 9.5, 9.5, 9.5, 9.1 および 9.2 log cfu/g であった。ロイシンの添加量が 1000 および 5000 mg/L の場合、ロイシン無添加と比較して 18 時間発酵後の生菌数がわずかに減少したが有意な差ではなかった ($p < 0.05$)。

AJ01 株を還元脱脂乳中で 30°C, 18 時間培養した場合、ロイシンの添加によって 3-メチルブタナール生産量は増加したものの、添加量を 100~5000 mg/L の範囲で増加させても 3-メチルブタナール生産量は増加せず、むしろ、5000 mg/L 添加した場合は低下が見られた。このことから、100 mg/L より高い濃度のロイシンの添加は、3-メチルブタナールに変換されうる量を超えていることが考えられた。

30°C で 18 時間の条件で、Nurvhush ら (1998) は *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* INF-DM1 を牛乳で培養した場合 0.3 mg/L の 3-メチルブタナールを生産することを報告した。また、Meng ら (2021) は *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FAM-17841 を還元脱脂乳 (9.5% w/w) で培養した場合 1.72 mg/L の 3-メチルブタナールを生産すると報告した。本研究では、AJ01 株を還元脱脂乳 (10% w/v) で培養したところ、1.17 mg/L の 3-メチルブタナールが生産された。この値は、Nurvhush ら (1998) の報告より約 4 倍高く、Meng ら (2021) の結果と比較して少なかった。

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* FAM-17841 をロイシンを 131.17 mg/L 添加した還元脱脂乳 (9.5%, w/w) で培養した場合、3-メチルブタナール生産量がロイシン無添加と比較して 2 倍に増加したという報告がある (Meng ら 2021)。本研究でも同様の傾向が見られた。すなわち、ロイシンを 100 mg/L 添加した場合の AJ01 株の生産した 3-メチルブタナール濃度 (3.15 mg/L) はロイシン無添加 (1.17 mg/L) と比較して 2.7 倍増加した。また、Meng ら (2021) は α -ケトグルタル酸とロイシンの共添加および α -ケトイソカプロン酸の添加はロイシン添加した場合より 3-メチルブタナール生産を増加させると報告した。そのため、AJ01 株の場合もこれらの物質を添加し培養することで、ロイシンを添加した場合より 3-メチルブタナール生産量が増加するかもしれない。

ロイシンの添加量が増加すると AJ01 株発酵乳の滴定酸度が低下することが分かった。グリシンが細菌の生育を阻害するという報告 (駒形ら 1968) があり、本研究においては、

ロイシンも同様に AJ01 株の生育を抑制し、その結果、滴定酸度が低下したことが予想された。しかしながら、ロイシンの添加によって滴定酸度は低下したものの、生菌数の低下は見られなかった。また、ロイシンの添加量が多くなるほど AJ01 株の 3-メチルブタナール生産量が増加した。よって、AJ01 株の場合、ロイシンを添加し培地中にロイシンが大量にある条件下では乳糖から乳酸への代謝が抑制され、ロイシンから 3-メチルブタナールへの代謝が促進した可能性も考えられた。

<発酵温度が AJ01 株の 3-メチルブタナール生産に及ぼす影響>

ロイシンを 100 mg/L 添加した培地において、発酵温度が AJ01 株の 3-メチルブタナール生産に及ぼす影響を調べた (図 6)。また、発酵温度が AJ01 株の生酸性に及ぼす影響も調べた (図 6)。すなわち、ロイシンを 100 mg/L 添加した培地に AJ01 株を接種し、10℃、20℃および 30℃で 48 時間目まで培養しその間の 3-メチルブタナール濃度および滴定酸度を測定した。その結果、培養温度によって AJ01 株の 3-メチルブタナール生産および乳酸生成の挙動が異なることが分かった。

培養温度 10℃の場合、培養 0 時間目から 24 時間目まで 3-メチルブタナールは検出されず、36 時間目に 0.71 mg/L、48 時間目に 6.27 mg/L であった (図 6 A)。培養温度 20℃の場合、培養 0 時間目は 3-メチルブタナールは検出されず、9 時間目に 0.97 mg/L、18 時間目に 7.38 mg/L、24 時間目に 3.38 mg/L、36 時間目に 0.99 mg/L、48 時間目に 0.89 mg/L であり、18 時間目が最高濃度であった (図 6 B)。培養温度 30℃の場合、培養 0 時間目は 3-メチルブタナールは検出されず、7 時間目に 4.48 mg/L、8 時間目に 6.43 mg/L、9 時間目に 6.20 mg/L、13 時間目に 4.29 mg/L、18 時間目に 3.66 mg/L、24 時間目に 3.63 mg/L、36 時間目に 2.74 mg/L、48 時間目に 3.18 mg/L であり、8 時間目が最高濃度であった (図 6 C)。

滴定酸度は培養温度に関わらず、培養 0 時間目は 0.13~0.14%であり、発酵温度が 20℃および 30℃の場合は 48 時間以内に 0.7%以上に達し乳の酸凝固が見られた。しかしながら、乳の酸凝固に達するまでの発酵時間は発酵温度によって異なった。すなわち、発酵温度 20℃では 48 時間、発酵温度 30℃では 13 時間かかった。発酵温度 10℃では 48 時間発酵させても滴定酸度は 0.44%にとどまり、凝乳が見られなかった。

AJ01 株を発酵乳製造に用いるためには、乳酸を生産させ、凝乳させる必要がある。そのため、発酵乳の製造には 30℃を用いることにした。

AJ01 株の乳酸生産が盛んで凝乳が早いことから、乳酸生産に適した培養温度は 10℃、20℃および 30℃の中では 30℃であることが考えられた。一方、AJ01 株の 3-メチルブタナール生産量は 30℃の最高濃度である 6.43 mg/L より 20℃の最高濃度である 7.38 mg/L が高かった。以上より、AJ01 株において乳酸生産と 3-メチルブタナール生産に適した温度は異なり、乳酸生成の方が高温で 3-メチルブタナール生産の方が低温であることが考えられた。ただし、Narvhus ら (1998) の報告では乳酸生産および 3-メチルブタナール生産の両方で高温が適している結果があるため、最適温度は菌株に依存する可能性があった。

<NaCl の添加とその場合のロイシンの有無が AJ01 株の 3-メチルブタナール生産に及ぼす影響>

NaCl およびロイシンの共添加が AJ01 株の 3-メチルブタナール生産、乳酸生産および生菌数に及ぼす影響について調べた (図 7)。その結果、ロイシンの有無に関わらず 3-メチルブタナール生産、乳酸生産および生菌数は NaCl の添加によって低下し ($p < 0.05$)、NaCl の添加量が増加するほど低下した。すなわち、ロイシン無添加の場合の NaCl 無添加、2% 添加、4% 添加および 6% 添加の 3-メチルブタナール濃度はそれぞれ 1.17 mg/L, 0.99 mg/L, 0.47 mg/L および 0 mg/L であった (図 7 A)。ロイシンを添加した場合の 3-メチルブタナール濃度は、NaCl 無添加、2% 添加、4% 添加および 6% 添加でそれぞれ 3.15 mg/L, 1.41 mg/L, 0.93 mg/L および 0 mg/L であった (図 7 A)。ロイシンの有無に関わらず 3-メチルブタナール生産は NaCl の添加によって低下するが、ロイシンを添加した方が培地中の 3-メチルブタナール量は多くなることが分かった。

ロイシンの有無に関わらず、18 時間培養した場合の滴定酸度も NaCl の添加によって低下し ($p < 0.05$)、NaCl の添加量が増加するほど滴定酸度が低下した (図 7 B)。すなわち、発酵 0 時間目の滴定酸度は NaCl の添加量に関わらず 0.11~0.12% であったが、18 時間発酵させた場合、NaCl 無添加、2% 添加、4% 添加および 6% 添加の場合の滴定酸度はそれぞれ 0.61~0.66%, 0.63~0.64%, 0.36~0.37% および 0.11~0.12% であった。

生菌数はロイシンの有無に関わらず 4% 以上の NaCl の添加によって低下した ($p < 0.05$) (図 7 C)。すなわち、培養 0 時間目の生菌数は NaCl の添加量に関わらず 3.7~3.8 log cfu/mL であったが 18 時間培養した場合、NaCl 無添加、2% 添加、4% 添加および 6% 添加した場合の生菌数はそれぞれ 9.5 log cfu/mL, 9.2~9.6 log cfu/mL, 7.4~7.9 log cfu/mL および 3.1~3.3 log cfu/mL であった。

アミノ酸添加培地で 3-メチルブタナールを生産する菌株を培養した場合、培地へ 4% の NaCl を添加した場合、NaCl 無添加と比較して 3-メチルブタナール生産量が増加した報告 (Brandsma ら 2022) がある。これは、菌株が、NaCl の添加による浸透圧に対抗するためにアミノ酸の取り込みを増やしたことが原因だと考えられている。そこで、NaCl とロイシンを共添加した還元脱脂乳で AJ01 株を培養した場合、NaCl の添加による浸透圧に対抗するために AJ01 株のロイシン取り込みが促進し、3-メチルブタナール生産量が増加することが予想された。しかしながら、実際に試験した結果ロイシンの有無に関わらず NaCl の添加によって 3-メチルブタナール生産量は減少し、報告の結果と異なった。Brandsma ら (2022) の報告では 4% の NaCl を添加した場合の生菌数 (8.6 log cfu/mL) は NaCl 無添加 (8.7 log cfu/mL) と同様であったが、AJ01 株の場合は 4% の NaCl を添加した場合の生菌数 (7.9 log cfu/mL) は NaCl 無添加 (9.5 log cfu/mL) と比較して 1.6 log cfu/mL 減少した。これは、菌株に依存する耐塩性の強さや培地に含まれるアミノ酸の量の違いに関連することが考えられ、AJ01 株の場合、NaCl の添加によって生菌数が減少してしまったため 3-メチルブタナール生産量の増加が見られなかった可能性があった。

＜発酵乳中の 3-メチルブタナールの保存性試験＞

3-メチルブタナールを生産する乳酸菌である AJ01 株を用いて発酵乳を製造し、8℃で 5 日間保存した場合の 3-メチルブタナール濃度の推移を調べた（図 8）。その結果、発酵温度によって発酵乳中の 3-メチルブタナール濃度は異なるが、すべての試験において 5 日間の保存後に 3-メチルブタナール濃度は減少した。

30℃で 5 時間発酵させ、その後 1 日、2 日、3 日、4 日および 5 日間 8℃で保存した場合の 3-メチルブタナール濃度は、ロイシン無添加で 0.10, 0.41, 0.00, 0.00 および 0.00 mg/L であり、100 mg/L ロイシン添加で 1.57, 4.84, 5.97, 1.81, 0.82, 0.79 および 0.48 mg/L であった（図 8 A）。試験中は常にロイシン無添加のものより 100 mg/L ロイシン添加のもので高濃度の 3-メチルブタナールが検出された。ただし、30℃で 5 時間発酵させた時点の滴定酸度はロイシン無添加および 100 mg/L ロイシン添加で 0.20% および 0.21% であり、凝乳が見られず発酵乳とは言えなかった。30℃で 24 時間発酵させ、その後 1 日、2 日、3 日、4 日および 5 日間 8℃で保存した場合の 3-メチルブタナール濃度は、ロイシン無添加で 1.45, 0.98, 0.90, 0.56, 0.62 および 0.31 mg/L であり、100 mg/L ロイシン添加で 4.59, 2.96, 2.41, 1.50, 1.09, 1.25 および 1.12 mg/L であった（図 8 B）。ロイシンの有無に関わらず、30℃で 24 時間発酵させた時点の発酵乳中の 3-メチルブタナール濃度が最も高く、保存中に減少する様子が見られた。また、試験中は常にロイシン無添加発酵乳より 100 mg/L ロイシン添加発酵乳で高濃度の 3-メチルブタナールが検出され、ロイシンの添加によって 24 時間発酵後の 3-メチルブタナール濃度が 3 倍高まった。また、ロイシンの有無に関わらず保存中に 3-メチルブタナール濃度は減少するものの、ロイシンを添加していた方が保存 5 日目に 3.6 倍多く残存していた。

ロイシンの有無に関わらず、発酵乳中の 3-メチルブタナール濃度は保存中に減少する様子が見られた。この結果は、30℃で 24 時間の発酵によって培地中のロイシンが枯渇し、保存中に 3-メチルブタナールが生産されなかったことが原因である可能性が考えられた。そこで、発酵終了後にロイシン水溶液を追加で添加し、同じく 8℃で 5 日間保存した場合の 3-メチルブタナール濃度を調べた（図 8 C）。ロイシン水溶液の追加により AJ01 株によって 3-メチルブタナールが生産され、保存中の濃度が増加することが予想されたが、実際の試験ではロイシン水溶液を追加しない場合と同様に保存中に 3-メチルブタナール濃度が減少する様子が見られた。すなわち、30℃で 24 時間発酵後、8℃での保存 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目および 5 日目の濃度は 4.66, 3.68, 1.89, 1.34, 0.74 および 0.67 mg/L であった。発酵乳の保存 1 日目には、ロイシン水溶液を追加していないもの（2.96 mg/L）と比較してロイシン水溶液を追加したもの（3.68 mg/L）の方が 3-メチルブタナール濃度が高かったが、保存 2 日目以降はロイシンを追加したものがロイシン水溶液を追加していないものと比較して 3-メチルブタナール濃度が高くなる様子は見られなかった。

本実験では、保存中の 3-メチルブタナール濃度の減少を防ぐことはできなかったが、30℃で 24 時間発酵後 8℃で 5 日間保存した発酵乳中の 3-メチルブタナール濃度は、チー

ズ中の 3-メチルブタナール識別閾値である 0.15 mg/L (Chen ら 2020) より約 2 倍高い 0.31 mg/L であった。原料乳に 100 mg/L のロイシンを添加し 30°C で 24 時間発酵後 8°C で 5 日間保存した発酵乳中の 3-メチルブタナール濃度は識別閾値より約 8 倍高い 1.25 mg/L であった。AJ01 株を用いて発酵乳を製造した場合、発酵乳中の 3-メチルブタナール濃度は識別閾値を超えた濃度であるため、ナッツ臭豊かな発酵乳ができることが分かり、原料乳にロイシンを添加するとさらにナッツ臭が増強することが分かった。原料乳へのロイシンの添加には、無添加と比較して、発酵乳の保存中にナッツ臭を高いレベルで維持する効果があることも分かった。Jo ら (2018) は、種々の熟成期間および原産国における市販ゴーダチーズの 3-メチルブタナール濃度を測定し、熟成期間の長いチーズにおいて 3-メチルブタナールが高濃度で存在することを報告した。その中で最高濃度は、18 ヶ月程度熟成されたチーズにおける 0.09 mg/L であった。この値は識別閾値より低いものであるが、ナッツ臭を呈する他のストレッカーアルデヒドが加わってチーズのナッツ臭を形成していることが考えられた。本研究では、原料乳に 100 mg/L のロイシンを添加し、30°C で 24 時間発酵させた AJ01 株発酵乳において、3-メチルブタナール濃度が 4.59 mg/L 検出された。その後、保存中に濃度は減少したが、保存 4 日目および 5 日目には約 1 mg/L の濃度で維持された。これらの結果から、AJ01 株を用いてチーズ製造を行うことで、通常 18 ヶ月熟成が必要とされる 3-メチルブタナールの濃度を、熟成初期において実現できる可能性が示唆された。また、AJ01 株を用いてチーズを製造した場合、熟成前の凝乳の段階で 3-メチルブタナール濃度が高いほど熟成中に 3-メチルブタナールが減少しても高濃度で残存することが予想された。

熟成初期 (1~3 か月熟成) のチーズと 1 年程度熟成したチーズの違いとして、ナッツ臭の有無がある (Jo ら 2018) が、同時に、熟成によって独特の風味、味覚、滑らかな組織と食感の形成も起こる (齋藤 2010)。本研究の結果より、30°C、24 時間で製造した発酵乳中の 3-メチルブタナール濃度が最も高く、その後、濃度が減少することが示された。食用に適するチーズの品質にはナッツ臭以外の風味、味覚および組織と食感の形成が必要であるため、少なくとも熟成過程で他の要素が変化し、食用に適するようになる 3 か月間までは、3-メチルブタナール濃度を好ましい範囲 (0.15~0.3 mg/L, Chen ら 2020) 内に維持することが望ましい。したがって、3-メチルブタナール濃度の維持が課題となる。3-メチルブタナール濃度が低下する要因として、①揮発、②3-メチルブタン酸や 3-メチルブタノールへの代謝が考えられる。これらを踏まえ、3-メチルブタナールを残存させる方法として以下の三つが考えられる。一つ目は、ロイシンの添加により 3-メチルブタナールの初期濃度を高めることで、減少後も任意の濃度を維持できる可能性がある。本研究の結果からも、この方法の有効性が示唆された。二つ目は、貯蔵方法の検討である。すなわち、3-メチルブタナールの揮発を防ぐため、貯蔵温度やパッケージの最適化を行うものである。まず、3-メチルブタナールが揮発によって減少するのか、代謝によって減少するのかを明らかにすることが重要である。三つめは、代謝の抑制である。3-メチルブタナールが代謝に

よって減少することが明らかになった場合、3-メチルブタナールの代謝を触媒する酵素を阻害することで、濃度の低下を防ぐことができると考えられる。以上の方法を検討することで、チーズの熟成過程における3-メチルブタナール濃度を適切に維持できる可能性がある。

第一節で、AJ01株を用いた発酵乳の製造試験を行った結果、発酵乳の保存試験中は常にチーズ中の3-メチルブタナールの識別閾値である0.15 mg/Lを超える濃度が検出され、AJ01株は熟成初期にナッツ臭のするチーズを製造するのにふさわしい菌株であることが示唆された。また、原料乳に100 mg/Lのロイシンを添加すると発酵乳中の3-メチルブタナール濃度が増加し、保存中に濃度が高いレベルで維持されることも分かった。

AJ01株において、3-メチルブタナール生産に適した条件についても分かった。すなわち、還元脱脂乳に100 mg/Lのロイシンを添加し、20°Cで18時間培養したときに最も高濃度である7.38 mg/Lが生産された。

AJ01株を還元脱脂乳で30°C、18時間培養した場合に1.17 mg/Lの3-メチルブタナールを生産した。これは、牛乳で*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* IMF-DM1を30°C、18時間培養したNurvhusら（1998）の報告（0.3 mg/L）より約4倍高い値であり、還元脱脂乳（9.5%, w/w）で*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FAM-17841を30°Cで18時間培養したMengら（2021）の報告（1.72 mg/L）より低い値であった。また、Chenら（2021）は、ロイシンが1311.7 mg/L含まれているAA培地（10 mM α -ケトグルタル酸、0.2 mM NADH、0.1 mM ピリドキサール5'-リン酸および各10 mM 18種類のアミノ酸）で14株の*L. lactis*を30°Cで一晩培養した場合のそれぞれの株の3-メチルブタナール生産量を測定した。その結果、408株が12 mg/L生産し最も高く、次いでIMJ10-7株の4.13 mg/Lであり、最も低い生産量はWZ1-2株の0.06 mg/Lであった。AJ01株は3-メチルブタナール生産に最適な培養条件下（100 mg/L ロイシン添加還元脱脂乳で20°Cで18時間培養）で7.38 mg/Lを生産した。培養条件が異なるため単純な比較をすることはできないが、AJ01株はChenら（2021）の使用したAA培地より少ないロイシンの量であるにも関わらず、3番目に高い生産量であった。以上より、AJ01株は、比較的高濃度の3-メチルブタナールを生産する菌株だと考えられた。AJ01株が高濃度の3-メチルブタナールを生産する理由の一つとして3-メチルブタナールの代謝経路に関わる酵素の遺伝子に変異が起きたことが関与していると予想された。

第二節では、まずAJ01株の3-メチルブタナール代謝経路を明らかにした。3-メチルブタナール代謝には直接経路と間接経路があり、間接経路のみを使用するか、両方の経路を使用するかは菌株に依存することが分かっている（Chenら 2021）。本研究では、AJ01株の3-メチルブタナール代謝に関わる酵素のうち、直接経路を触媒する α -ケト酸デカルボキシラーゼおよび間接経路を触媒するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の遺伝子および酵素活性を調べ、AJ01株がどの経路で3-メチルブタナール代謝を行っているかを明らかにした。さらに、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の塩基配列4715 bpの相同性を検索し

た。

第二節 ナッツ臭製造株である *Lactococcus cremoris* AJ01 における 3-メチルブタナール代謝経路についての研究

材料および方法

<PCR による遺伝子の増幅>

L. cremoris AJ01 のゲノム DNA の抽出

使用した試薬

TES 緩衝液 (pH8.0)

1 M Tris-HCl (pH8.0)	10 mL
0.5 M EDTA (pH8.0, with NaOH)	0.1 mL
スクロース	8.6 g

水で 100 mL に定容。高圧滅菌する。

SDS (20%) 溶液

1 M Tris-HCl (pH8.0)	5 mL
0.5 M EDTA (pH8.0)	4 mL
SDS	20 g

水で 100 mL に定容。高圧滅菌はしない。

TE 緩衝液 (pH8.0)

1 M Tris-HCl (pH8.0)	1.0 mL
0.5 M EDTA (pH8.0)	0.2 mL

水で 100 mL に定容。高圧滅菌する。

Loading Dye

1 M Tris-HCl (pH8.0)	0.1 mL
0.5 M EDTA (pH8.0)	1.0 mL
グリセロール	3.0 mL
ブロムフェノールブルー	0.006 g
水	6.0 mL

高圧滅菌する。

RNase 入り TE 緩衝液 (200 µg/mL)

RNase in stock solution (10 mg/mL)	20 µL
TE 緩衝液	780 µL
Loading dye	200 µL

このまま使用

TAE buffer (×50)

Tris	242.0 g
酢酸	57.1 mL

EDTA (0.5 M, pH8.0) 100 mL

水で 1000 mL に定容。高圧滅菌はしない。

3%NaCl 飽和フェノール

1. 凝結しているフェノール（特級）を 68°C のウォーターバスで融解した。これに 8-ヒドロキシキノリンを 0.05% 量加えた。
2. 等量の 3%NaCl を加え、混合し、その後静置して水層（無色上層）を除く。この操作を数回繰り返すと 3%NaCl で飽和した中性のフェノール液ができる。冷蔵保存で数ヶ月はもつ。

ゲノム DNA 抽出

培養液 5 mL を遠心 (1500G, 10 min) し、マイクロチューブに移し、遠心 (9000 rpm, 1 min) し、上澄液を捨てた。TES 緩衝液を 1 mL 加え、攪拌してマイクロチューブに移し、遠心 (9000 rpm, 1 min) し、上澄液を捨てた。TES 緩衝液 (リゾチーム : 10 mg/mL) 500 μ L を加え、攪拌後 37°C で 30 分間反応させた。SDS (20%) 溶液を 50 μ L 加え、手で攪拌し 37°C で 10 分間反応させた。5 M 酢酸カリウム溶液を 72 μ L 加え、手で攪拌し氷上に 1 分間静置した。3%NaCl 飽和フェノール 500 μ L とフェノール・クロロホルム混液 (1 : 1) 100 μ L を入れ、激しく攪拌した。遠心 (13000 rpm, 10 分, 4°C) し、上澄液 600 μ L を新しいチューブに取った。きれいになるまで繰り返した。クロロホルム・イソアミルアルコール混液 (24 : 1) 500 μ L を入れ、攪拌したのち遠心 (13000 rpm, 5 分, 4°C) し、上澄液を新しいチューブに取った。等量の冷イソプロパノールを加え、手で攪拌し -20°C に数時間置いた。遠心 (13000 rpm, 10 分, 4°C) し、上清をゆっくり捨てた。冷エタノール 800 μ L を加え、攪拌せずに遠心 (13000 rpm, 5 分) した。上澄液を捨て、37°C で 15~30 分間乾燥させた。RNase 入り TE 緩衝液 (0.01 M) を 20 μ L 加えた。TAE 緩衝液で満たした電気泳動層に 1.5% アガロースゲル (厚さ 5 mm 以下, ナカライ > 1 kb) を置き、各サンプルウェルに試料を 5~10 μ L ずつ注入する。100 V の定電圧で 25 分間泳動したのち、ゲルを取り出し、3 μ g/mL のエチジウムブロマイド溶液に 15 分間浸した。

α -ケト酸デカルボキシラーゼおよびピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のプライマーと PCR による検出

Chen ら (2021) の報告にあるプライマーを使用して PCR を行った (表 1)。Chen ら (2021) が、*L. lactis* において α -ケト酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が見つからずピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体が 3-メチルブタナールの生合成に機能する可能性があることを報告していた。そのため本研究では、3-メチルブタナール代謝の間接経路を触媒する酵素としてピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のプライマーを用いた。

PCR 操作法

PCR 反応液

10 倍緩衝液 (NEW ENGLAND Biolabs) 5 μ L

dNTP 溶液 (NEW ENGLAND Biolabs)	1 μ L
10 μ M センスプライマー	1 μ L
10 μ M アンチセンスプライマー	1 μ L
耐熱性 DNA ポリメラーゼ (5,000 U/mL, NEW ENGLAND Biolabs)	0.25 μ L
水	40 μ L

PCR 操作法

PCR 反応液に鋳型 DNA を 2 μ L 加え、以下の条件を基本として PCR を行った。すなわち、はじめに 95°C30 秒のホットスタートを行い、95°C30 秒、55°C30 秒、68°C1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。基本の PCR 条件からアニーリング温度や伸張反応の時間を変更して PCR 反応を行った。反応終了後の PCR 液 5 μ L を 1 μ L のローディング緩衝液と混合し、1.5%アガロースゲルのウェルに供し、1 倍 TAE 緩衝液中で電気泳動した。このとき 1 または 2.5 kb のルーラー (BIO RAD) も一緒に泳動した。100 V の定電圧で 25 分間泳動したのち、ゲルを取り出し、3 μ g/mL のエチジウムブロマイド溶液に 15 分間浸した。トランスイルミネーター (主波長：312 nm) で観察し、鮮明な 1 本の標的サイズバンドが得られていることを確認した。得られた PCR 産物に精製は Fast Gene のゲル/PCR 抽出キットを用いて行った。

<塩基配列の解析>

プライマー pdhA-forward-1 と pdhD-reverse-1 を用いて増幅した PCR 産物を精製した後、塩基配列を解析する際の鋳型とし、6 つのプライマーを用いて塩基配列の解析を行った。使用したプライマーは pdhA-forward-1, pdhA-forward-2, pdhB-forward-1, pdhB-forward-2, pdhD-reverse-1 および pdhD-reverse-2 であった (表 1, 図 9)。塩基配列の解析はマクロジェンに依頼した。得られた塩基配列を BLAST 検索 ([BLAST: Basic Local Alignment Search Tool](#)) によりデータベースと照合した。Clustal Omega ([Job Dispatcher < EMBL-EBI](#)) を用いて、データベース上で相動性のあった菌株 2 株と Multiple alignment を行った。

<アミノ酸配列の解析>

得られた塩基配列を VectorBuilder (<https://www.vectorbuilder.jp/tool/dna-translation.html>) を用いてアミノ酸配列に変換した。アミノ酸配列を BLAST 検索 ([BLAST: Basic Local Alignment Search Tool](#)) によりデータベースと照合した。

<酵素活性測定>

無細胞抽出液 (CFE) の調製

三角フラスコに蒸留水と脱脂乳 (20%, w/v) を入れ、別の三角フラスコに蒸留水と寒天 (3%, w/v) を入れ、それぞれ 105°C で 5 分間高圧蒸気滅菌を行った。滅菌後の還元脱脂乳と寒天水溶液をクリーンベンチ内で混合した後、滅菌済みシャーレに無菌的に分注し固化させたものを脱脂乳寒天培地とした。賦活化した AJ01 株を滅菌生理食塩水で 10²倍希

釈した希釈液を脱脂乳寒天培地に 100 μ L 添加しコンラージ棒で塗り広げ、20°Cで 18 時間培養した。培養後の脱脂乳寒天培地に滅菌生理食塩水を添加した後コンラージ棒でこすり、菌体が懸濁した生理食塩水を蓋つき 15 mL 試験管に採取した。採取した菌体懸濁生理食塩水を 2 mL 容蓋つきチューブに 200 μ L ずつ分注し、そこに 0.5 mm ガラスビーズを 1.5 g 添加した。その後、ビーズ式細胞破碎装置で 3000 rpm, 5 分間細胞を破碎した。その間 1 分ごとにチューブを取り出し氷水上で冷却した。細胞破碎後、菌体懸濁生理食塩水の 10 倍量の生理食塩水をビーカーに用意し、1000 μ L マイクロピペットを用いてチューブの中身を生理食塩水に懸濁した。懸濁液を 1000 μ L マイクロピペットを用いて 2 mL 容蓋つきチューブに 1.5 mL ずつ分注し 10000 g, 4°Cで 5 分間遠心分離を行った。遠心分離後、上澄み液をポアサイズ 0.22 μ L のフィルターでろ過し、ろ液を CFE とした。CFE は酵素反応測定に使用するまで 4°Cで保管し、12 時間以内に測定を行った。培地へのロイシン添加が酵素の発現に及ぼす影響を調べるため、蒸留水にロイシンを 100 mg/L 溶解した後脱脂乳を溶解し、その他の工程は上記のものと同様に行ったロイシン添加 CFE も作成した。

アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性

Afzal ら (2012) の方法を参考にして行った。

使用した試薬

3-メチルブタナール 150 mM

NAD⁺ 0.25 mM

リン酸緩衝液 (100 mM, pH6.5)

リン酸緩衝液 (2 mL) に 3-メチルブタナールおよび NAD⁺を溶解した。CFE を 1 mL 添加しピペッティングにより攪拌した。30°Cに保った吸光度計で 340 nm における吸光度を 10 分ごとに 100 分間測定した。タンパク質量はブラッドフォード法で測定した。酵素比活性は以下の式で計算した。

酵素の比活性 = NAD⁺の還元量 (nmol) / タンパク質量 (mg) / 100 分

α -ケト酸デカルボキシラーゼ活性

Smit ら (2005) の方法を参考にして行った。

使用した試薬

α -ケトイソカプロン酸 10 mM

MgCl₂ 1 mM

チアミンピロリン酸 0.1 mM

クエン酸ナトリウム緩衝液 (50 mM, pH6.3)

α -ケトイソカプロン酸, MgCl₂およびチアミンピロリン酸をそれぞれクエン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、100 mM, 10 mM および 1 mM の溶液を調製した。試験管に α -ケトイソカプロン酸 (100 mM), MgCl₂ (10 mM) およびチアミンピロリン酸 (1 mM)をそれぞれ 100 μ L ずつと CFE を 700 μ L 入れ、全量 1 mL の酵素反応溶液とした。酵素反応溶液が入

った試験管にシリコン栓で蓋をし、30℃に加温したウォーターバスで15分間反応させた。反応後の酵素反応液にアセトニトリル水溶液（80%，w/v）を1 mL 加えボルテックスで攪拌した後1000g×5分間遠心分離を行った。遠心分離後の上澄み液をポアサイズ0.22 μm の PES フィルターでろ過し、ろ液400 μL と DNPH 溶液40 μL を混合し暗所で40分以上誘導体化させた後 HPLC で3-メチルブタナールを定量した。タンパク質はブラッドフォード法で測定した。酵素の比活性は以下に示す式で表された。

酵素の比活性 = 3-メチルブタナール生成量 (nmol) / タンパク質量 (mg) / 15 分

酵素反応液中の CFE を滅菌生理食塩水に置き換えたものをブランクとして HPLC 分析に供した。ブランクは30℃で15分間の反応を行わなかった。その他は前述した方法と同様に行った。

CFE 中の3-メチルブタナールの定量も行った。5 mL 容試験管中で CFE 1 mL とアセトニトリル水溶液（80%，w/v）1 mL を混合した後1000 g で5分間遠心分離を行った。遠心分離後の上澄み液をポアサイズ0.22 μm の PES フィルターでろ過し、ろ液400 μL と DNPH 溶液40 μL を混合し暗所で40分以上誘導体化させた後 HPLC で CFE 中の3-メチルブタナールを定量した。

実験は CFE の調製を3回行い、さらに、1つの CFE につき3回行った。結果は9回の平均を示した。

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性

Luo ら（2018）の方法を参考にして行った。

使用した試薬

NAD⁺ 25 mM

α-ケトイソカプロン酸 7.5 mM

MgCl₂ 35 mM

チアミンピロリン酸 1 mM

CoA 7.5 mM

リン酸緩衝液（100 mM, pH6.0）

NAD⁺, α-ケトイソカプロン酸, MgCl₂, チアミンピロリン酸および CoA をそれぞれリン酸緩衝液に溶解し、25 mM, 75 mM, 350 mM, 10 mM および 75 mM の溶液を調製した。マイクロチューブ（1.5 mL 容）に NAD⁺（25 mM）、α-ケトイソカプロン酸（75 mM）、MgCl₂（350 mM）、チアミンピロリン酸（10 mM）および CoA（75 mM）をそれぞれ100 μL ずつと CFE を500 μL 入れ、ボルテックスで攪拌し、全量1 mL の酵素反応溶液とした。酵素反応溶液を12,000 g で5分間遠心分離した。上澄み液を1 mL 容量の石英ガラス吸光度測定セルに入れ、30℃に保った吸光度計で340 nm における吸光度を1分ごとに30分間測定した。本研究では、吸光度の上昇が30分より前に停止したため、吸光度の上昇が継続していた最初の10分間における NAD⁺ の還元量を酵素比活性の算出に用いた。

タンパク質量はブラッドフォード法で測定した。

酵素比活性は以下の式で計算した。

$$\text{酵素の比活性} = \text{NAD}^+\text{の還元量 (nmol)} / \text{タンパク質量 (mg)} / 10 \text{ 分}$$

CFE の調製を 3 回行い、各 CFE について実験を 3 回ずつ行った。結果は、計 9 回の測定値の平均として示した。

ブラッドフォード法

使用した試薬

CBB G-250 50 mg

エタノール 25 mL

リン酸 50 mL

BSA 水溶液 20 µg/mL

エタノール 25 mL に CBB-250 を 50 mg 溶解し、その後リン酸を 50 mL 加え、攪拌した。蒸留水を用いて 500 mL にメスアップし、脱脂綿でろ過したものをブラッドフォード試薬とした。(室温保存、数か月保存可能) BSA 水溶液 (20 µg/mL) と蒸留水を全量が 1000 µL になるように混合 (表 2) した後ブラッドフォード試薬を 2 mL ずつ添加し、570 nm で吸光度を測定し検量線を作成した。作成した検量線をもとに CFE および α -ケトイソカプロン酸デヒドロゲナーゼ酵素反応液中のタンパク質量を測定した。

結果および考察

<PCR による遺伝子の増幅>

PCR 1 回目 (図 10A)

PCR の温度設定は、はじめに、95°C30 秒のホットスタートを行い、95°C-30 秒、55°C-30 秒、68°C-1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。その後は 4°C まで冷却した。PCR 産物は、DNA の増幅を確認するために 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。その結果、*pdhD*-forward-1 と *pdhD*-reverse-1 (*pdhD*) のバンドは見られたが、*kdcA*-forward と *kdcA*-reverse (*kdcA*)、*pdhA*-forward-1 と *pdhA*-reverse-1 (*pdhA*)、*pdhB*-forward-1 と *pdhB*-reverse-1 (*pdhB*) および *pdhC*-forward と *pdhC*-reverse (*pdhC*) のバンドは確認できなかった。

PCR 2 回目 (図 10B)

PCR の温度設定は、はじめに、95°C30 秒のホットスタートを行い、95°C-30 秒、58°C-30 秒、68°C-1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。その後は 4°C まで冷却した。PCR 産物は、DNA の増幅を確認するために 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。その結果、*pdhA*、*pdhB* および *pdhD* のバンドは見られたが、*kdcA* および *pdhC* のバンドは確認できなかった。

PCR 3 回目 (図 10C)

PCR の温度設定は、はじめに、95°C30 秒のホットスタートを行い、95°C-40 秒、58°C-40 秒、68°C-70 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。その後は 4°C まで冷却した。

PCR 産物は、DNA の増幅を確認するために 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。その結果、*pdhA*、*pdhB* および *pdhD* のバンドは見られたが、*kdcA* および *pdhC* のバンドは確認できなかった。

PCR 4 回目 (図 10D)

kdcA および *pdhC* の PCR のみ以下の条件で行った。

PCR の温度設定は、はじめに、95°C30 秒のホットスタートを行い、95°C-40 秒、52°C-40 秒、68°C-70 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。その後は 4°Cまで冷却した。PCR 産物は、DNA の増幅を確認するために 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。その結果、*kdcA* のバンドは確認できず、*pdhC* では非特異的なバンドが 2 本見られた。

PCR 5 回目 (図 10E)

kdcA および *pdhC* の PCR のみ以下の条件で行った。

PCR の温度設定は、はじめに、95°C30 秒のホットスタートを行い、95°C-40 秒、60°C-40 秒、68°C-70 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。その後は 4°Cまで冷却した。PCR 産物は、DNA の増幅を確認するために 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。その結果、*kdcA* および *pdhC* のバンドは確認できなかった。*kdcA* が PCR で増幅されないことから、AJ01 株は *kdcA* 遺伝子を持っていないことが考えられた。

PCR 6 回目 (図 10F)

Chen ら (2021) は、*L. lactis* IL 1403 の *pdh* 複合体遺伝子は 5'から 3'の方向で *pdhD*、*pdhC*、*pdhB*、*pdhA* の順に並んでいると報告した。よって、PCR 6 回目では、プライマー *pdhD*-forward-1 と *pdhA*-reverse-1 を用いて以下の条件で *pdh* の PCR を行った。

PCR の温度設定は、はじめに、95°C30 秒のホットスタートを行い、95°C-40 秒、58°C-40 秒、68°C-70 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。その後は 4°Cまで冷却した。PCR 産物は、DNA の増幅を確認するために 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。その結果、*pdh* のバンドは確認できなかった。

PCR 7 回目 (図 10G)

NCBI で *Lactococcus* のピルビン酸デヒドロゲナーゼの塩基対数を検索したところ、*Lactococcus* の *pdhA* 4 件、*pdhB* 4 件および *pdhC* 1 件が見つかった。見つかった *pdhA*、*pdhB* および *pdhC* の塩基対数はおよそ 1000 bp であることが分かった。*pdhD* も約 1000 bp であると予想し、*pdh* 複合体はおよそ 4000 bp であると予想した。本研究で使用した TaqDNA ポリメラーゼの伸長時間は 1 分あたり 1000 bp である。4000 bp と予想した *pdh* 複合体の伸張を行うために伸長反応時間を 4 分間に延長した。

1. *pdhA*-forward-1 および *pdhB*-reverse-1, 2. *pdhA*-forward-1 および *pdhD*-reverse-1, 3. *pdhB*-forward-1 および *pdhA*-reverse-1, 4. *pdhB*-forward-1 および *pdhD*-reverse-1, 5. *pdhD*-forward-1 および *pdhA*-reverse-1, 6. *pdhD*-forward-1 および *pdhD*-reverse-1 を用いてそれぞれ PCR を行った。

PCR の温度設定は、はじめに、95°C30 秒のホットスタートを行い、95°C-40 秒、58°C-40 秒、68°C-4 分を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。その後は 4°Cまで冷却した。PCR 産物は、DNA の増幅を確認するために 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

その結果、1. pdhA-forward-1 と pdhB-reverse-1, 2. pdhA-forward-1 と pdhD-reverse-1, 4. pdhB-forward-1 と pdhD-reverse-1, 7. pdhD-forward-1 と pdhD-reverse-1 のバンドが見られ、*pdh* 複合体は *pdhA*, *pdhB*, *pdhC*, *pdhD* の順で並んでおり、pdhA-forward-1 と pdhD-reverse-1 を用いて増幅した PCR 産物の大きさは、予想した通り 4,000 bp に近いことが分かった。

それぞれの PCR 産物の大きさは、2. pdhA-forward-1 と pdhB-reverse-1 が 2,500 bp 以下、3. pdhA-forward-1 と pdhD-reverse-1 が 5,000 bp 以下、5. pdhB-forward-1 と pdhD-reverse-1 がレーン 2 よりわずかに小さく、8. pdhD-forward-1 と pdhD-reverse-1 が約 100 bp で最も小さいという結果であった。

<塩基配列の解析>

PCR の結果から、AJ01 株は直接経路を触媒する α -ケト酸デカルボキシラーゼを持たないことが分かった。そこで、AJ01 株の 3-メチルブタナール生産には間接経路を触媒するピルビン酸デヒドロゲナーゼが関与していることが示唆された。すなわち、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの塩基配列の保存性が 3-メチルブタナール生産に影響を及ぼしていると予想した。AJ01 株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の塩基配列を用いて BLAST 検索を行った結果、*Lactococcus cremoris* のものと 99%以上、*Lactococcus lactis* のものと 89%の相同性が確認された。高い相同性が見られた *L. cremoris* の中で、3-メチルブタナール生産について報告がある (Bunt ら 2014) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 および *Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris* MG1363 との塩基配列の相同性について詳細に解析を行った (図 11)。

SK11 株は 3-メチルブタナールを生産しない菌株である一方、AJ01 株および MG1363 株は 3-メチルブタナールを生産する菌株である。塩基配列の比較では、AJ01 株と SK11 株の間で 99.76%, AJ01 株と MG1363 株の間で 99.06%の相同性が認められ、AJ01 株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の塩基配列は 3-メチルブタナールを生産しない SK11 株との相同性が高かった。

塩基配列の違いが、アミノ酸の配列の相違を引き起こす可能性が考えられたためアミノ酸配列に翻訳した後、相同性検索を行った。

AJ01 株のピルビン酸デヒドロゲナーゼの塩基配列を用いてプライマー配列の検索を行った結果、pdhC-forward および pdhC-reverse の配列が見つからなかった (図 11)。したがって、PCR で pdhC が増幅しなかった原因は、AJ01 株のピルビン酸デヒドロゲナーゼの塩基配列にこれらのプライマー配列が存在しないことにあると考えられる。このことから、AJ01 株のピルビン酸デヒドロゲナーゼの塩基配列において、pdhC-forward および

pdhC-reverse の部分に変異が生じている可能性が示唆された。

<アミノ酸配列の解析>

AJ01 株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の E1- α は 35 番目の塩基から 934 番目の塩基, E1- β は 699 番目の塩基から 1871 番目の塩基, E2 は 1843 番目の塩基から 3450 番目の塩基, E3 は, 3669 番目の塩基からはじまっていたが終始コドンが来る前に配列が終了していたため配列の途中までしか得られなかった。AJ01 株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 E1- α , E1- β , E2 および E3 のアミノ酸配列を用いて BLAST 検索を行った。その結果, *L. cremoris* と E1- α は 100%, E2 は 100%, E3 は 100% の相同性があった。E1- β は *L. cremoris* と 99.69% の相同性があった。塩基配列の相同性を調べた場合は, AJ01 株の配列は 3-メチルブタナールを生産しない SK11 株との相同性 (99.76%) が高かったがアミノ酸配列に翻訳した場合は SK11 株および MG1363 株の両方のアミノ酸配列とほとんど違いがなく, 塩基配列の違いはアミノ酸配列に影響をほとんど及ぼさないものであった (図 11, 12)。

AJ01 株の E1- β のアミノ酸は *L. cremoris* と 99.69% の相同性であり, 総アミノ酸 391 個のうち 1 アミノ酸が異なっていた。この違いがピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の酵素活性に影響を及ぼしている可能性があった。しかしながら, 1 アミノ酸の違いが酵素活性に影響を及ぼさないことも考えられた。その場合は, 菌株の 3-メチルブタナール生産に影響を及ぼすものとして, ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のプロモーター領域における塩基配列の変化が転写効率に影響を与え, その結果として 3-メチルブタナール生産能力の有無が表現型に現れることも考えられた。さらに, 3-メチルブタナール生産に関与する複数の酵素をコードする他の遺伝子の変化が重要な役割を果たしている可能性もある。

アクセッションナンバー

L. cremoris AJ01 のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の遺伝子配列は, DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のデータベースに登録番号 (pdhA : LC859859, pdhB : LC859245, pdhC : LC859246, pdhD : LC859860) として登録された。

<酵素活性測定>

アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性

AJ01 株のアルデヒドデヒドロゲナーゼは検出されなかった (表 3)。酵素反応による吸光度の上昇 (NAD⁺ から NADH への還元に伴う吸光度の上昇) が見られなかったため, 3-メチルブタナールから 3-メチルブタン酸への代謝が行われていないことが示唆された。

α -ケト酸デカルボキシラーゼ活性

培地へのロイシン添加の有無に関わらず, AJ01 株の α -ケト酸デカルボキシラーゼ活性は検出されなかった (表 4)。すなわち, 酵素反応溶液の HPLC を行った結果 3-メチルブタナールのリテンションタイムである 15 分に検出されたピーク面積は 3000~9000 であり, この面積値は検量線の下限值である 0.1 mg/L のときの HPLC のピーク面積より小さい値であった。そのため, AJ01 株の α -ケト酸デカルボキシラーゼ活性は検出されなかつ

た。また、CFE 中の 3-メチルブタナール濃度を測定した結果 0.1~0.4 mg/L であり、CFE 中に 3-メチルブタナールが含まれていることが分かった。よって、酵素反応液の HPLC で検出されたピーク面積である 3000~9000 という値は酵素反応によって生成された 3-メチルブタナールではなく CFE 中に含まれていたものが検出されたと考えられた。以上の結果と PCR で *kdcA* が増幅されなかったことから、AJ01 株は α -ケト酸デカルボキシラーゼを持たないことが示唆された。Chen ら (2021) の報告では、14 株中の *Lactococcus lactis* のうち、2 株でのみ α -ケト酸デカルボキシラーゼ活性が見られ、残りの 12 株は AJ01 株と同様に検出されなかった。

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性

培地へのロイシン添加の有無に関わらず、AJ01 株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性が検出され、その値は培地へのロイシン無添加の場合で 10.1 ± 1.65 nmol/mg/分、100 mg/L のロイシンを添加した場合 10.2 ± 2.11 nmol/mg/分であった (表 5)。酵素活性測定の結果および PCR によって *pdh* が増幅されたことから、AJ01 株はピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性を有しており、間接経路によってロイシンから 3-メチルブタナールの生産を行っていることが考えられた。

Chen ら (2021) の研究では α -ケト酸デカルボキシラーゼとピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体両方の酵素活性を持つ株ほど 3-メチルブタナール生産量が多いという結果であった (*L. lactis* 408 株, IMJ10-7 株)。よって、菌株が両方の代謝経路を使うと 3-メチルブタナールを多く生産することが予想された。しかしながら、*L. lactis* は両方の経路を持つ菌株が少ない可能性があり (Luo ら 2018 ; Chen ら 2021), AJ01 株も両方の経路を持つ菌株ではなかった。AJ01 株は間接経路しか持たないにも関わらず、比較的多く 3-メチルブタナールを生産することから、 α -ケト酸デカルボキシラーゼ活性は 3-メチルブタナール生産に必須のものではないことが示された。また、AJ01 株が 3-メチルブタナールを比較的多く生産する要因としてピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性が関わっていると予想し、実験を行った。その結果、AJ01 株の 10.1 nmol/mg/分という値は YN2-1 株の 9.19 および GXB10-2 株の 11.76 nmol/mg/分と近似していた。しかし、この 2 株の 3-メチルブタナール生産量は AJ01 株の生産した最高値 (7.38 mg/L) より低かった (YN2-1 株 : 1.6 mg/L, GXB10-2 株 : 0.96 mg/L, Chen ら 2021)。よって、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性は 3-メチルブタナール生産量が高い菌株を見つける際の指標にはならないことが示唆された。以上より、 α -ケト酸デカルボキシラーゼ活性とピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性のいずれも、AJ01 株が高濃度の 3-メチルブタナールを生産する要因ではないことが示唆された。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性以外に、3-メチルブタナール生産に関与する要因として、ロイシンから 3-メチルブタナールへの代謝を触媒する種々の酵素の活性が考えられた。

培地へロイシンを 100 mg/L 添加した場合、AJ01 株の 3-メチルブタナール生産量が 2.7 倍になった。よって、培地へロイシンを 100 mg/L 添加した場合、AJ01 株のピルビン酸デ

ヒドロゲナーゼ複合体活性が上昇している可能性が考えられた。実際に調べた結果、AJ01株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性はロイシンの有無に関わらず有意な差は見られなかった。このことから、ロイシンの添加によるAJ01株の3-メチルブタナール生産能力の上昇はピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性の上昇が原因ではないことが示唆された。ロイシンの添加によってピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性は上昇しなかったが、基質濃度が増加したことでピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体が3-メチルブタナールに結合する確率が高まり、その結果3-メチルブタナールの生産量が増加したことが考えられた。

まとめ

本研究では、ナッツ臭を呈する物質である3-メチルブタナールを生産する乳酸菌、*L. cremoris* AJ01を用い、熟成初期からナッツ臭がするチーズの製造に寄与することが目的であった。熟成初期にナッツ臭がするチーズの製造は、チーズの熟成期間の短縮、それによるコストカットにつながるものである。そのために、第一節では、AJ01株の3-メチルブタナール生産を増加させる培養条件を検討した。すなわち、培地への3-メチルブタナールの前駆体であるロイシンの添加やNaClの添加、培養温度および培養時間などの培養条件を調査した。さらに、AJ01株を用いて発酵乳を製造し、原料乳へのロイシンの添加が発酵乳中の3-メチルブタナール量および発酵乳保存中の3-メチルブタナール量の推移に及ぼす影響についても調べた。第二節では、3-メチルブタナール生産に関与すると予想された、AJ01株の α -ケト酸デカルボキシラーゼおよびピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の遺伝子および酵素活性を調べた。

培地に3-メチルブタナールの前駆体であるロイシンを添加し、AJ01株を培養した結果3-メチルブタナールの生産量が増加することが分かった。ただし、ロイシンの添加量には限界が存在し、100 mg/Lの添加量が最適であることが分かった。次に100 mg/Lのロイシンを添加した培地でAJ01株が最も多い3-メチルブタナールを生産する培養温度と培養時間を調べた。その結果20°Cで18時間培養したときに最高濃度である7.38 mg/Lが観察された。次に、培地へのNaClの添加とその場合のロイシンの有無がAJ01株の3-メチルブタナール生産に及ぼす影響について調べた。その結果、ロイシンの有無に関わらずNaClの添加は3-メチルブタナール量を低下させた。次に、AJ01株を用いて発酵乳を製造し、発酵乳中の3-メチルブタナール量および発酵乳保存中の3-メチルブタナール量の推移を調べた。発酵乳の保存試験中は常にチーズ中の3-メチルブタナールの識別閾値以上の濃度が検出され、さらに、先行研究の18ヶ月熟成したチーズ中の濃度より高濃度が検出されたことから、AJ01株は熟成初期にナッツ臭のするチーズを製造するのにふさわしい菌株であることが示唆された。また、原料乳に100 mg/Lのロイシンを添加すると発酵乳中の3-メチルブタナール濃度が増加し、保存中の3-メチルブタナール濃度を高いレベルで維持する効果があることも分かった。AJ01株の3-メチルブタナール生産量は、本研究と同じく牛乳培地で培養した先行研究の値と比較して約4倍高い様子が見られ、AJ01株の比較的多い

3-メチルブタナール生産量に3-メチルブタナール代謝を触媒する酵素のアミノ酸配列や酵素活性に特徴があると予想した。そこで、本研究では3-メチルブタナール代謝経路のうち、直接経路を触媒する α -ケト酸デカルボキシラーゼおよび間接経路を触媒するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のアミノ酸配列と酵素活性を測定した。その結果、AJ01株は α -ケト酸デカルボキシラーゼを持っておらず、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体は持つことが分かり、AJ01株は間接経路によって3-メチルブタナールを生産していることが示唆された。AJ01株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の塩基配列は*L. lactis*（相同性89%）より*L. cremoris*（相同性99%以上）の方が相同性が高かった。AJ01株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体E1- α 、E2およびE3のアミノ酸配列は*L. cremoris*と100%の相同性があった。AJ01株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体E1- β のアミノ酸配列は*L. cremoris*と99.69%の相同性であり、総アミノ酸391個のうち1アミノ酸が異なっていた。この違いが3-メチルブタナール代謝に及ぼす影響については今後の研究課題である。本研究では α -ケト酸デカルボキシラーゼ活性とピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性のいずれも、AJ01株が高濃度の3-メチルブタナールを生産する要因ではないことが示唆された。すなわち、 α -ケト酸デカルボキシラーゼおよびピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性を測定した結果、 α -ケト酸デカルボキシラーゼ活性は検出されなかったため、 α -ケト酸デカルボキシラーゼ活性は3-メチルブタナール生産に必須ではないことが示された。また、先行研究でAJ01株と同程度のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性を持つにも関わらずAJ01株より顕著に低い3-メチルブタナール生産量である菌株が存在したため、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性は3-メチルブタナール生産が高い菌株の指標にはならないことが示された。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性以外に、3-メチルブタナール生産に関与する要因として、ロイシンから3-メチルブタナールへの代謝を触媒する種々の酵素の活性が考えられた。また、AJ01株は原料乳に100 mg/Lのロイシンを添加すると3-メチルブタナール生産量が増加することが分かった。そこで、ロイシン添加によりピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の発現量が高まることが予想されたが、実際に試験した結果AJ01株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の発現量の上昇は見られなかった。このことから、ロイシンの添加によるAJ01株の3-メチルブタナール生産量の増加はピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性の上昇が原因ではないことが示唆され、単に基質が増加したことに起因すると考えられた。

本研究では、以下に示すことが明らかになった。①AJ01株は、培地に100 mg/Lのロイシンを添加し、20°Cで18時間培養することで、最大である7.38 mg/Lの3-メチルブタナールを生産することが分かった。この値は、先行研究の値と比較して顕著に高いものであった。②原料乳への100 mg/Lのロイシンの添加は、発酵乳中の3-メチルブタナール濃度を増加させ、さらに、保存中の3-メチルブタナール濃度を高いレベルで維持する効果も見られた。このことから、チーズ製造においても、原料乳への100 mg/Lのロイシンの添加は、チーズ中の3-メチルブタナール濃度を増加させ、チーズの熟成期間も3-メチルブタナ

ールを高濃度に保つことに寄与する可能性が考えられた。③AJ01 株の 3-メチルブタナール生産には、 α -ケト酸デカルボキシラーゼは関与しておらず、間接経路であるピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体が関与していることが示唆された。AJ01 株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の遺伝子配列は *L. cremoris* と高い相同性があり、1 アミノ酸の違いのみが見られた。④ α -ケト酸デカルボキシラーゼ活性は 3-メチルブタナール生産に必須ではなく、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体活性は 3-メチルブタナール生産が高い菌株の指標にはならないことが示された。また、ロイシンの添加による 3-メチルブタナール生産量の増加はピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体発現量の上昇によるものではないことが示された。

本研究の結果から、AJ01 株は熟成初期からナッツ臭豊かなチーズの製造に寄与する可能性が示された。この成果により、嗜好性の高いナッツ臭豊かなチーズの製造が可能となり、ハードタイプチーズの熟成期間を短縮し、製造コストの削減にも貢献することが期待される。また、本研究は、消費者のニーズに応じた食品の提供を可能にし、食産業全体の発展にも寄与するものと考えられる。本研究の成果を用い、熟成初期からナッツ臭のするチーズ製造を行うためには、カゼインの分解を行うレンネットの添加や凝乳後に水分を抜く工程がチーズ中の 3-メチルブタナール濃度に及ぼす影響についてさらに調べる必要がある。また、3-メチルブタナールを生産しない乳酸菌に AJ01 株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 E1- β に見られた 1 アミノ酸の変異を起こし、3-メチルブタナールの生産性を調べることで 1 アミノ酸の変異が 3-メチルブタナール生産に及ぼす影響が明らかになることが考えられた。

謝辞

本論文執筆においてご指導くださいました弘前大学大学院地域共創科学研究科産業創成科学専攻 津田 治敏 准教授, 同専攻 岩井 邦久 教授, 同専攻 石本 雄大 准教授, AJ01 株発酵乳の香気成分の分析を行ってくださった同専攻 前多 隼人 准教授, AJ01 株発酵乳および還元脱脂乳の GC/MS 分析を行ってくださった青森県産業技術センター弘前工業研究所発酵食品開発部様に感謝申し上げます。

参考文献

- Afzal MI, Delaunay S, Paris C, Borges F, Revol-Junelles AM, Cailliez-Grimal C. 2012. Identification of metabolic pathways involved in the biosynthesis of flavor compound 3-methylbutanal from leucine catabolism by *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28. International Journal of Food Microbiology **157**, 332–339.
- Afzal MI, Boulahya KA, Paris C, Delaunay S, Cailliez-Grimal C. 2013. Effect of oxygen on the biosynthesis of flavor compound 3-methylbutanal from leucine catabolism during batch culture in *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28. Journal of Dairy Science **96**, 352–359.
- Avsar YK, Yuceer YK, Drake MA, Singh TK, Yoon Y, Cadwallader KR. 2004. Characterization of Nutty Flavor in Cheddar Cheese. American Dairy Science Association **87**, 1999–2010.
- Amarita F, Plaza ML, Palencia PF, Requena T, Pelaez C. Cooperation between wild lactococcal strains for cheese aroma formation. 2006. Food Chemistry **94**, 240–246.
- Ayad EHE, Verheul A, Jong C, Wouters JTM, Smit G. 1999. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. International Dairy Journal **9**, 725–735.
- Bunt B, Bron PA, Sijtsma L, Vos WM, Hugenholtz J. 2014. Use of non-growing *Lactococcus lactis* cell suspensions for production of volatile metabolites with direct relevance for flavour formation during dairy fermentations. Microbial Cell Factories **13**, 176–184.
- Brandsma JB, Floris E, Dijkstra ARD, Rijnen L, Wouters JA, Meijer WC. 2008. Natural diversity of aminotransferases and dehydrogenase activity in a large collection of *Lactococcus lactis* strains. International Dairy Journal **18**, 1103–1108.
- Brandsma JB, Rustandi N, Brinkman J, Wolkers-rooijackers JCM, Zwietering MH, Smid EJ. 2022. Pivotal role of cheese salting method for the production of 3-

- methylbutanal by *Lactococcus lactis*. International Journal of Dairy Technology **75**, 421-430.
- Chen C, Zhou W, Yu H, Yuan J, Tian H. 2020. Evaluation of the perceptual interactions among aldehydes in a Cheddar cheese matrix according to odor threshold and aroma intensity. Molecules **25**, 4308-4323.
- Chen C, Yuan J, Yu H, Wang B, Huang J, Yuan H, Xu Z, Zhao S, Tian H. 2021. Characterization of metabolic pathways for biosynthesis of the flavor compound 3-methylbutanal by *Lactococcus lactis*. Journal of Dairy Science **105**, 97–108.
- Chen L, Liu R, He C, Wu M, Ge Q, Yu H. 2024. Biosynthesis pathway of flavor compound 3-methylbutanal derived from leucine by *Lactococcus lactis* 517: From a transcriptomics perspective. Food Bioscience **61**, 104740-104753.
- Drake MA, Mcingvale SC, Gerard PD, Cadwallader KR, Civille GV. 2001. Development of a descriptive language for Cheddar cheese. Journal of food science **66**, 1422-1427.
- Dunn HC, Lindsay RC. 1985. Evaluation of the role of microbial strecker-derived aroma compounds in unclean-type flavors of Cheddar cheese. Journal of Dairy Science **68**, 2859-2874.
- Fernandez PP, Plaza ML, Amarita F, Requena T, Pelaez C. 2005. Diversity of amino acid converting enzymes in wild lactic acid bacteria. Enzyme and Microbial Technology **38**, 88–93.
- Helinck S, Bars DL, Moreau D, Yvon M. 2004. Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **70**, 3855–3861.
- Jackson HW, Morgan ME. 1954. Identity and origin of the malty aroma substance from milk cultures of *Streptococcus lactis* var. *maltigenes*. Journal of Dairy Science **37**, 1316-1324.
- Jo Y, Benoist DM, Ameerally A, Drake MA. 2018. Sensory and chemical properties of Gouda cheese. Journal of Dairy Science **101**, 1967–1989.
- Kanda Y. 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. Bone Marrow Transplantation **48**, 452-458.
- 駒形和男, 小川博望, 福島清, 伊藤武. 1968. グリシンによる微生物の生育阻害. 食品衛生学雑誌 **9**, 289-294.
- Luo J, Jiang C, Zhao L, Zhang M, Wang F, Sun E, Ren F. 2018. Keto acid decarboxylase and keto acid dehydrogenase activity detected during the biosynthesis of flavor compound 3-methylbutanal by the nondairy adjunct culture *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* F9. Journal of Dairy Science **101**, 9725–9735.

- Masson F, Hinrichsen L, Talon R, Montel MC. 1999. Factors influencing leucine catabolism by a strain of *Staphylococcus carnosus*. *International Journal of Food Microbiology* **49**, 173–178.
- Meng HY, Piccand M, Fuchsmann P, Dubois S, Baumeyer A, Stern MT, Ah U. 2021. Formation of 3-methylbutanal and 3-Methylbutan-1-ol recognized as malty during fermentation in Swiss Raclette-type cheese, reconstituted milk, and de man, rogosa, and sharpe broth. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* **69**, 717-729.
- Morales P, Garcia EF, Gaya P, Nunez M. 2003. Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese. *International Dairy Journal* **13**, 201–209.
- Narvhus JA, Osteraas K, Mutukuira T, Abrahamsen RK. 1998. Production of fermented milk using a malty compound-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* **41**, 73-80.
- Palencia PF, Plaza ML, Amarita F, Requena T, Pelaez C. 2006. Diversity of amino acid converting enzymes in wild lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* **38**, 88–93.
- Petersen CV, Beck HC, Lauritsen FR. 2004. On-line monitoring of important organoleptic methyl-branched aldehydes during batch fermentation of starter culture *Staphylococcus xylosus* reveal new insight into their production in a model fermentation. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* **85**, 298-305.
- 齋藤忠夫. 2010. チーズ製造の基本フロー. In: 齋藤忠夫, 堂迫俊一, 井越敬司 (編著), 現代チーズ学, 第2版, pp. 73-91. 株式会社食品資材研究会, 東京.
- Sheldon RM, Lindsay RC, Libbey LM, Morgan ME. 1971. Chemical nature of malty flavor and aroma produced by *Streptococcus lactis* var. *maltigenes*. *American Society for Microbiology* **22**, 263-266.
- Smit BA, Engels WJM, Bruinsma J, Vlieg JETH, Wouters JTM, Smit G. 2004a. Development of a high throughput screening method to test flavour-forming capabilities of anaerobic micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 306–313.
- Smit BA, Engels WJM, Wouters JTM, Smit G. 2004b. Diversity of L-leucine catabolism in various microorganisms involved in dairy fermentations, and identification of the rate-controlling step in the formation of the potent flavour component 3-methylbutanal. *Microbial Biotechnology* **64**, 396–402.
- Smit BA, Vlieg JETH, Engels WJM, Meijer L, Wouters JTM, Smit G. 2005.

- Identification, Cloning, and Characterization of a *Lactococcus lactis* Branched-Chain -Keto Acid Decarboxylase Involved in Flavor Formation. American Society for Microbiology **71**, 303-311.
- Thierry A, Maillard MB, Yvon M. 2002. Conversion of L-leucine to isovaleric acid by *Propionibacterium freudenreichii* TL 34 and ITGP23. American Society for Microbiology **68**, 608-615.
- Whetstine MEC, Drake MA, Broadbent JR, McMahon D. 2006. Enhanced nutty flavor formation in cheddar cheese made with a malty *Lactococcus lactis* adjunct culture. Journal of Dairy Science **89**, 3277-3284.
- Young ND, Drake M, Lopetcharat K, McDaniel MR. 2004. Preference Mapping of Cheddar Cheese with Varying Maturity Levels. Journal of Dairy Science **87**, 11-19.
- Zhang XY, Guo HY, Zhao L, Sun WF, Zeng SS, Lu XM, Cao X, Ren FZ. 2011. Sensory profile and Beijing youth preference of seven cheese varieties. Food Quality and Preference **22**, 101-109.
- Ziadi M, Bergot G, Courtin P, Chambellon E, Hamdi M, Yvon M. 2010. Amino acid catabolism by *Lactococcus lactis* during milk fermentation. International Dairy Journal **20**, 25-31.

第二章 グルコース添加カッテージチーズにおける食中毒細菌の挙動

要約

本研究では、グルコースを添加したカッテージチーズにおける食中毒細菌の挙動を調べた。酸・レンネット法により pH の異なるカッテージチーズを製造し、チーズにグルコースおよび食中毒細菌を接種したのち冷蔵保存し、生菌数を経時的に 168 時間目まで測定した。食中毒細菌には *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* および *Escherichia coli* の 3 種類を用いた。その結果、*L. monocytogenes* および *E. coli* は、いずれの pH のチーズにおいてもグルコースの添加による増殖促進効果は見られなかったが *S. aureus* subsp. *aureus* は増殖促進効果が見られた。このことから、カッテージチーズへのグルコースの添加は、食中毒細菌の種類によっては食中毒リスクが上昇する危険性があることが示唆された。

キーワード： *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Escherichia coli*, チーズ, グルコース, *Listeria monocytogenes*

緒言

日本におけるチーズの消費量は増加傾向で推移している。これは近年の食生活の洋風化とともにチーズが家庭の食卓に根付いてきたことが背景だと考えられる（若林 2010）。チーズ需要が高まる中、農林水産省および生産者は酪農の発展、国産チーズの生産・競争力の強化、国産チーズの品質向上・ブランド化への取り組みなどを活発に行っており、酪農の6次産業化を進める動きも見られる。

乳および乳製品は栄養素が豊富な食品であり、*Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* および *Clostridium botulinum* などの食中毒細菌にとって優れた培地になり得る (Pal ら 2016; 柳平ら 2010)。日本では 65°C・30 分間または 72~75°C・15 秒間の殺菌を行った原料乳からナチュラルチーズが製造されることが多い（齋藤 2010）。これらの殺菌工程では、汚染菌の滅菌には至らず、製品の保存中に生残菌が増殖する可能性がある。

近年、チーズの需要増加と共に販売されるチーズ関連食品の種類が増加している。中には、デザート感覚で食べることを想定し、甘味や様々なフレーバーを付与した「乳等を主要原料とする食品」が市販されている。さらに現在では、ナチュラルチーズに甘味を付与する目的で糖（フルーツソースや砂糖漬けフルーツなど）を添加したものを販売する6次産業農家も現れている。

細菌をグルコースとその他の糖を含む培地で培養した場合、はじめにグルコースのみが優先して代謝されるカタボライト抑制という現象が見られる（高木と矢野 1997）。また、Danielle ら（2018）の研究では、炭素源がスクロースの場合よりグルコースの場合の方が *L. monocytogenes* の最大増殖速度が大きくなることが示された。

ナチュラルチーズに甘味を付与する目的でグルコースを添加したときに、原料乳の殺菌工程を生残した、あるいは出荷されるまでの工程で混入した *L. monocytogenes* などの食中毒細菌が、カタボライト抑制によって、生菌数が増加することが考えられた。すなわち、細菌が代謝する炭素源がラクトースではなくグルコースになり、ラクトースよりグルコースを代謝した方が生菌数が多く、また、増殖速度が大きくなることが考えられた。これは、通常ナチュラルチーズと比べて、食中毒リスクが上昇することを示唆しているが、これまでナチュラルチーズへのグルコースの添加がチーズ中の細菌の生育に及ぼす影響については注意がほとんど払われていない。また、乳および乳製品において見られる食中毒細菌である *S. aureus* subsp. *aureus* や *E. coli* についても同様に明らかになっていない。

ナチュラルチーズは熟成型チーズと非熟成型チーズに分類される（村山 2010）。非熟成型チーズには、カッテージチーズやモッツアレラチーズなどがあり、いずれもカードの熟成工程を経ないで製造されるチーズである（久米 2010）。カッテージチーズの製法は大きく分けて2つある。1つは脱脂乳に乳酸菌を添加し、乳酸発酵させることにより pH を乳タンパク質であるカゼインの等電点（pH4.6）付近にまで下げて凝固させる製法であり、も

う 1 つは脱脂乳に直接酸を添加して凝固させる直接酸添加法である。直接酸添加法のうち、伝統的な製法の一つに酸・レンネット法がある。この方法は、酸と凝乳酵素であるレンネットを併用するものである (Farkye 2004 ; 久米 2010)。酸・レンネット法では、凝乳酵素であるレンネットを用いるため pH4.6 以上のカッテージチーズの製造が可能である。本研究では、レンネットとクエン酸を用いてカッテージチーズの製造を行った。日本においては、酸味の少ないマイルドなヨーグルトが好まれることが知られている (福井 2009)。カッテージチーズはヨーグルトと同様に酸凝固で製造され、非熟成型の乳製品であり酸味が特徴であるが、ヨーグルトと同様に酸味を抑えたカッテージチーズを製造する 6 次産業農家もあるかもしれない。そして、一般に、大部分の細菌の増殖最適 pH は中性～微アルカリ性である (高見ら 1999)。酸味を抑えたカッテージチーズ、すなわち pH が中性に近いチーズは食中毒細菌が増殖しやすいと考えられたため、グルコース添加カッテージチーズの初期 pH が細菌の増殖に及ぼす影響についても調べることにした。

本研究の目的はカッテージチーズを冷蔵保存している間の食中毒細菌の増殖に、グルコースの添加とチーズの初期 pH が及ぼす影響について調べることである。本研究では、酸・レンネット法を用い様々な pH のカッテージチーズを製造した。それぞれの pH で製造したチーズを 2 つに分け、グルコースを添加したものと無添加のものを用意し、冷蔵保存した。その場合の、*L. monocytogenes*, *S. aureus* subsp. *aureus* および *E. coli* の生菌数を経時的に 168 時間目まで測定した。

材料および方法

<供試菌株>

供試菌株は *Listeria monocytogenes* SCOTT A (ATCC 49594, American Type Culture Collection, USA) および VTU 206 (日本細菌学会, 東京), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NBRC 12732, *Escherichia coli* NBRC 102203 (製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター, 千葉) である。供試菌株を 37°C で 24 時間培養したのち実験に使用した。培地には TYLG 培地 (トリプトン 10 g, 酵母エキス 5 g, グルコース 5 g, ラクトース 5 g, Tween80 1 g, L-システイン塩酸塩 0.1 g を水 1000 mL に溶解し高圧蒸気滅菌 (121°C, 15 分間), pH6.8±0.2) を使用した。

<レンネット溶液の調製>

レンネット (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH5.5, 0.1 M 酢酸および 0.1 M 酢酸ナトリウム水溶液で調製) に溶解したものをレンネット溶液とした。調製したレンネット溶液のソックスレー単位は以下の方法で算出した。ここで、1 ソックスレー単位とは 35°C の牛乳 1.0 mL を 40 分で凝固するものである (大条 1968)。低温殺菌牛乳 50 mL に塩化カルシウム溶液 (5%, w/v) を 1% 量添加し 35°C に加温した。乳が 35°C に達したことを確認し、レンネット溶液 0.5 mL を添加した。乳を 35°C で保持し、乳が凝固する時間を測定した。調製したレンネット溶液のソックスレー単位を算出する式は以下の通りである。

調製したレンネット溶液のソックスレー単位 (unit/mL) = 50(牛乳の量 mL) ÷ 0.5 (レンネット溶液の量 mL) × 40 分/ct

ct: 凝固にかかった時間 (分)

<カッテージチーズの製造>

カッテージチーズの製造は Farkye (2004) の方法を改変して行った。すなわち、脱脂粉乳 (ローヒートタイプ, よつば乳業, 北海道) および滅菌水 (高圧蒸気滅菌, 121°C, 15 分間) を用いて 10% (w/v) 還元脱脂乳 500 mL を調製し, 37°C に加温した。還元脱脂乳が 37°C に達したのち, クエン酸水溶液 (10% (w/v)) を用いて還元脱脂乳の pH を 6.0, 5.5, 5.0 および 4.5 に調整した (Table 1)。その後 pH 6.0 から 5.0 までは乳が 40 分で凝固する量のレンネット溶液を加えた (Table 1)。40 分とは, レンネット溶液を添加してから乳が凝固するまでの時間である。pH 4.5 では pH 5.0 と同量のレンネット溶液を加えた。クエン酸水溶液およびレンネット溶液を加えた後は溶液を均一に行きわたらせるためによく攪拌した。還元脱脂乳がゲル状に凝固したことを 40 分後に確認しカッティングを行った。還元脱脂乳は常に 37°C に保温し続けた。本研究では, 美鈴晒 (上海鈴蘭衛生用品有限公司, 上海, 中国) をチーズクロスとして使用した。高圧蒸気滅菌 (121°C, 15 分間) を行ったチーズクロスでカッティングしたカードを包みホエイを排除し試作カッテージチーズとした。製造したチーズを二つに分割し, チャック付きポリ袋 6P (生産日本社, 東京) にそれぞれ入れた (Figure 1)。両方に供試菌株の培養液を滅菌生理食塩水で希釈した希釈液を最終濃度が約 log 4.5 cfu/g になるようにチーズ重量の 1% (v/w) 添加した。その後, 一方にチーズ重量の 10% (w/w) 量のグルコース (富士フィルム和光純薬, 大阪) 粉末を添加した。グルコースを添加したチーズをグルコース添加チーズ, 添加していないものを無添加チーズとした。製造したチーズはすべて 10°C に設定した恒温器内で冷蔵保存した。その際, チーズ全体が 10°C になるようにチャック付きポリ袋内で平らに広げた。各供試菌株ごとに, カッテージチーズの製造を 3 回以上行った。

<生菌数測定>

冷蔵保存したカッテージチーズ中の供試菌株の生菌数を 0, 24, 72, 120 および 168 時間目まで経時的に測定した。ただし, *E. coli* は 120 時間目まで測定した。

L. monocytogenes は PALCAM 寒天培地 (BIOKAR Diagnostics, Allonne, France), *S. aureus* subsp. *aureus* はマンニット食塩寒天培地 (ラブレムコパウダー 0.5 g, ペプトン 5 g, 塩化ナトリウム 37.5 g, マンニット 5 g, フェノールレッド 0.0125 g, 寒天 7.5 g を水 500 mL に溶解し, 高圧蒸気滅菌 (121°C, 15 分間)), *E. coli* はデゾキシコレート培地 (日水製薬株式会社, 東京) を使用した。カッテージチーズ約 0.5 g を取り, チーズ重量の 10 倍量の滅菌生理食塩水を加えホモジナイズし, よく懸濁した。その後, 懸濁液を滅菌生理食塩水で段階希釈しそれぞれの希釈液 100 µL を寒天培地に塗抹した。寒天培地を 37°C で 48 時間培養したときの生菌数を計測した。同一段階希釈の試料に対し寒天培地を 2 枚用意し, 結果はその 2 枚の平均を示した。

<統計処理>

各 pH において、時間ごとにグルコース添加チーズと無添加チーズの間で student の t 検定を行った ($p < 0.01$)。また、各 pH において、グルコース添加チーズと無添加チーズのそれぞれで 0-24, 0-72, 0-120 および 0-168 時間目の間に対応のある t 検定を行った ($p < 0.01$)。どちらも両側の検定を行った。統計解析は Microsoft Excel 2016 を用いた。

結果

<カッテージチーズの製造>

各 pH のカッテージチーズを製造した。各 pH においてグルコース添加による初期 pH 値の変化は見られなかった。それぞれの pH のチーズの収量は原料乳 500 mL あたり pH6.0, pH5.5, pH5.0 および pH4.5 で 50 ± 2 g, 55 ± 2 g, 56 ± 2 g および 64 ± 4 g であった。

<*L. monocytogenes* SCOTT A の挙動>

すべての pH のチーズにおいてグルコースの添加による生菌数の増加は見られなかった (Figure 2)。pH4.5 のチーズにおいてはグルコースの有無に関わらず 168 時間目まで生菌数の増加は見られなかった ($p < 0.01$)。pH6.0, 5.5 および 5.0 のチーズではグルコースの有無に関わらず、24 時間目までは生菌数の増加は見られなかったが、それ以降生菌数は増加し ($p < 0.01$)、168 時間目において $\log 8.0$ cfu/g 以上の生菌数を示した。

<*L. monocytogenes* VTU 206 の挙動>

すべての pH のチーズにおいてグルコースの添加による生菌数の増加は見られなかった (Figure 3)。pH4.5 のチーズにおいてはグルコースの有無に関わらず 168 時間目まで生菌数の増加は見られなかった ($p < 0.01$)。pH6.0, 5.5 および 5.0 のチーズではグルコースの有無に関わらず生菌数は増加し ($p < 0.01$)、168 時間目において $\log 8.0$ cfu/g 以上に達した。

<*S. aureus* subsp. *aureus* NBRC 12732 の挙動>

pH6.0, 5.5 および 5.0 のチーズにおいてグルコースの添加による生菌数の増加が見られた (Figure 4) ($p < 0.01$)。すなわち、pH6.0, 5.5 および 5.0 のチーズでは 120 時間目まで生菌数の増加は見られず、168 時間目においてグルコース添加チーズでのみ生菌数の増加が見られた。pH4.5 のチーズにおいてはグルコースの有無に関わらず 168 時間目まで生菌数の増加は見られなかった ($p < 0.01$)。

<*E. coli* NBRC 102203 の挙動>

すべての pH のチーズにおいてグルコースの添加による生菌数の増加は見られなかった (Figure 5)。pH4.5 のチーズにおいてはグルコースの有無に関わらず 120 時間目まで生菌数の増加は見られなかった。pH6.0, 5.5 および 5.0 の無添加チーズでは 120 時間目まで生菌数は増加し $\log 6.0$ cfu/g 以上に達した。一方、グルコース添加チーズでは 120 時間目まで生菌数の増加は見られなかった ($p < 0.01$)。

考察

カッテージチーズへグルコースを添加した場合、カタボライト抑制が起こり、細菌の代謝する炭素源が変わることから、チーズ中の汚染菌は増加の傾向を示すと予想していた。本研究では、pH6.0, 5.5 および 5.0 のカッテージチーズにおいて培養 120 時間目以降に *S. aureus* subsp. *aureus* でグルコースの添加による増殖促進効果が見られたが、*L. monocytogenes* および *E. coli* はグルコースを添加しても増殖促進効果は見られなかった。*E. coli* においては、グルコースの添加によって増殖抑制効果および増殖速度の低下が見られた。グルコースとグルコースオキシダーゼが共存する場合、グルコン酸の生成による pH 低下効果または過酸化水素の生成によって細菌の増殖が抑制されるとの報告がある (Dobbenie ら 1995 ; Massa ら 2001) 。本研究においてもカッテージチーズへのグルコースの添加による、グルコン酸の生成に伴う pH 低下効果または過酸化水素の生成によって菌の増殖が抑制されたことが考えられる。また、グルコースとグルコースオキシダーゼの共存による増殖抑制効果は、活性の強いカタラーゼを持つ菌の場合その効果が弱まることが報告されている (Dobbenie ら 1995) 。本研究において、*S. aureus* subsp. *aureus* でのみグルコースの添加による増殖促進効果が見られた点には、それぞれの菌が持つカタラーゼ活性の強さが関与していることが考えられた。すなわち、*L. monocytogenes* および *E. coli* のカタラーゼ活性は同程度 (Anthony と Scott 1988) であるが、*S. carnosus* のカタラーゼ活性はおおよそ 50 倍高い (Barriere ら 2001) ことが報告されている。本研究では *S. aureus* subsp. *aureus* であるが *L. monocytogenes* および *E. coli* より高いカタラーゼ活性をもつことが考えられ、このことにより増殖が促進されたのかもしれない。

L. monocytogenes は株によって低温での生育や増殖速度などが異なるという報告がある (Eileen と Elmer 1987 ; Lianou ら 2006) 。本研究では 2 株の *L. monocytogenes* を用いたところ、2 株ともグルコースを添加しても増殖効果は見られなかった。しかし、増殖曲線は異なっており、pH6.0 のカッテージチーズにおいて SCOTT A 株より VTU 206 株の方が速く生菌数が増える傾向が見られた。

S. aureus subsp. *aureus* ではグルコースの添加により増殖促進効果が見られた。本研究では、初発の生菌数が約 log 4.0 cfu/g で 10°C, 168 時間保存したとき、pH6.0 では log 5.4 cfu/g まで生菌数が増加していた。この生菌数は毒素生成を行う生菌数と報告されている log 5 cfu/g (品川 2004) 以上であり、食中毒のリスクが高まることが示唆された。

結論

種々の pH のカッテージチーズにグルコースを添加した場合、高 pH のチーズでは食中毒細菌の増殖が促進すると予想した。そこで、カッテージチーズを冷蔵保存している間の食中毒細菌 *L. monocytogenes*, *S. aureus* subsp. *aureus* および *E. coli* の増殖に、グルコースとチーズの初期 pH が及ぼす影響について調べた。その結果、*L. monocytogenes* および *E. coli* の増殖促進効果は見られなかったが *S. aureus* subsp. *aureus* では増殖促進効果が見られた。それゆえ、カッテージチーズへのグルコースの添加は、食中毒細菌の種類によっては増殖を促進させ、それによって食中毒リスクを上昇させる危険性があることが示され

た。ただし、チーズの初期 pH を 4.5 まで下げること、そのリスクを低減できるかもしれない。

謝辞

本研究において、糖の添加量について試験を行った梶原沙妃女史、鋤柄陽平氏の助力に感謝申し上げます。

本研究は、技術報告として日本畜産学会報に掲載予定です。

参考文献

- Anthony WD, Scott EM. 1988. Catalase and superoxide dismutase activities after heat injury of *Listeria monocytogenes*. American Society for Microbiology **54**, 581-582.
- Barriere C, Leroy-setrin S, Talon R. 2001. Characterization of catalase and superoxide dismutase in *Staphylococcus carnosus* 833 strain. Journal of Applied Microbiology **91**, 514-519.
- Danielle R, Balay MG, Ganzle LM, Mullen M. 2018. The effect of carbohydrates and bacteriocins on the growth kinetics and resistance of *Listeria monocytogenes*. Frontiers in microbiology **9**, 1-12.
- Dobbenie D, Uyttendaele M, Debevere J. 1995. Antibacterial activity of the glucose oxidase/glucose system in liquid whole egg. Journal of Food Protection **58**, 273-279.
- Eileen MR, and Elmer HM. 1987. Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35°C. Journal of Food Protection **50**, pp. 452-463.
- Farkye NY. 2004. Acid-and acid/rennet-curd cheese part B: Cattage Cheese. In: Fox PF, McSweeney LH, Cogan TM, Guinee TP (eds) , *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition, pp. 329-341. ELSEVIER Academic Press, London.
- 福井宗徳. 2009. 発酵乳の過去・現在・未来～製造技術・機能性研究の変遷と今後の展望～. ミルクサイエンス **58**, 181-189.
- 久米仁司. 2010. カッテージチーズ. In: 齋藤忠夫, 堂迫俊一, 井越敬司 (編著), 現代チーズ学, 第2版, pp. 171-183. 株式会社食品資材研究会, 東京.
- Lianou A, Stopforth JD, Yoon Y, Wiedmann M, Sofos JN. 2006. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. Journal of Food Protection **69**, 2640-2647.
- Massa S, Petruccioli M, Brocchi GF, Altieri C, Sinigaglia M, Spano G. 2001. Growth inhibition by glucose oxidase system of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella*

- derby: in vitro* studies. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **17**, 287-291.
- 大条方義. 1968. 第 33 章チーズⅢ. レンネット. In: 佐々木林治郎 (監修), 大条方義, 津郷友吉, 中西武雄 (編集), 牛乳・乳製品ハンドブック, 第 15 版, pp. 372-374. 株式会社朝倉書店, 東京.
- Pal M, Mulu S, Tekle M, Pintoo SV, Prajapati JP. 2016. Bacterial contamination of dairy product. *Beverage & Food World* **43**, 40-43.
- 齋藤忠夫. 2010. チーズ製造の基本フロー. In: 齋藤忠夫, 堂迫俊一, 井越敬司 (編著), 現代チーズ学, 第 2 版, pp. 73-91. 株式会社食品資材研究会, 東京.
- 品川邦汎. 2004. 黄色ブドウ球菌. In: 玉木武 (発行), 食品衛生検査指針 微生物編 厚生労働省監修 2004, 第 1 版, pp. 236-248. 社団法人日本食品衛生協会, 東京.
- 高木正道, 矢野圭司. 1997. VI. 微生物の遺伝・育種. In: 高尾彰一, 枋倉辰六郎, 鶴高重三 (編集), 応用微生物学, 第 2 版, pp. 153-243. 文永堂出版株式会社, 東京.
- 高見伸治, 西瀬弘, 大塚暢幸, 長澤治子, 土居幸雄. 1999. 食品微生物学. 第 1 版, pp. 65-66. 株式会社建帛社, 東京.
- 村山重信. 2010. チーズの分類と名称. In: 齋藤忠夫, 堂迫俊一, 井越敬司 (編著), 現代チーズ学, 第 2 版, pp. 27-35. 株式会社食品資材研究会, 東京.
- 若林勝史. 2010. ナチュラルチーズ消費における習慣形成効果—動学的需要関数分析によるアプローチ—. *農業経済研究* **82**, 1-10.
- 柳平修一, 鈴木 明, 花形吾郎. 2010. チーズ製造の衛生管理. In: 齋藤忠夫, 堂迫俊一, 井越敬司 (編著), 現代チーズ学, 第 2 版, pp. 251-270. 株式会社食品資材研究会, 東京.

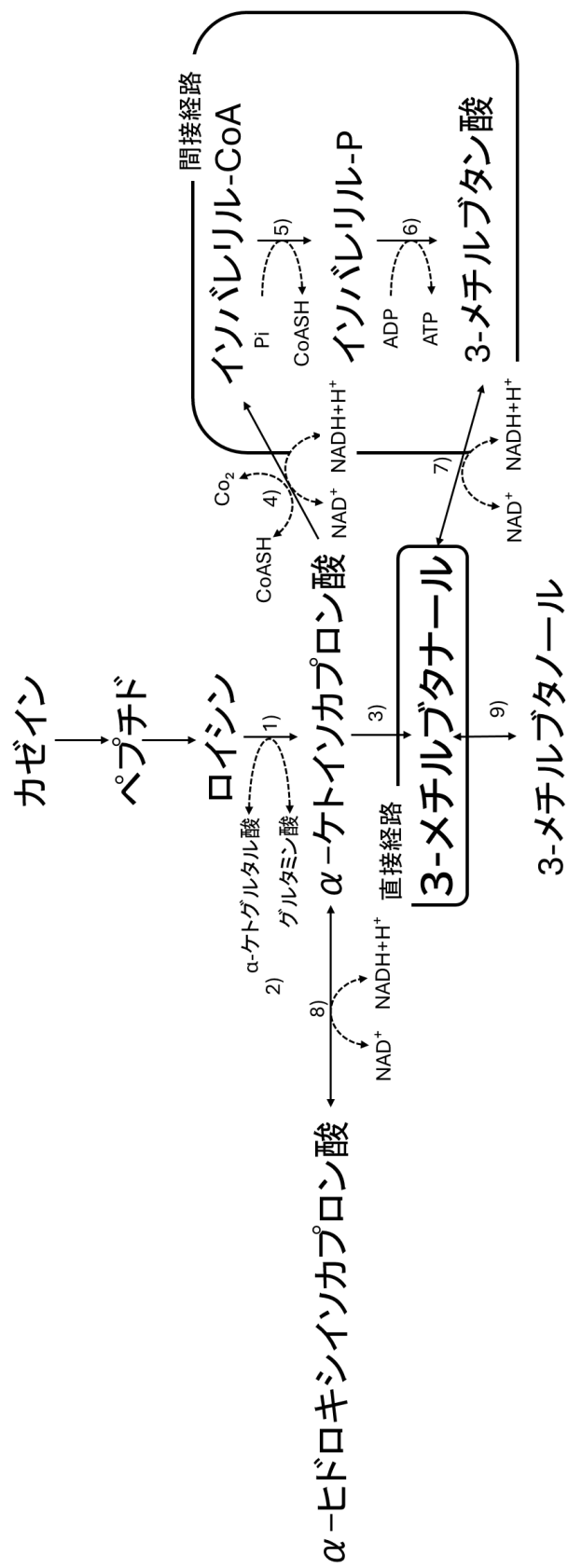


図1 3-メチルブタナール生成経路

1) アミノトランスフェラーゼ 2) グルタミン酸デヒドロゲナーゼ 3) α-ケト酸デカルボキシラーゼ 4) ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 (α-ケト酸デヒドロゲナーゼ) 5) ホスホトランスフェラーゼ 6) アシルキナーゼ 7) アルデヒドデヒドロゲナーゼ 8) α-ヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼ

9) アルコールデヒドロゲナーゼ (Afzal ら 2012 ; Afzal ら 2013 ; Chen ら 2024)

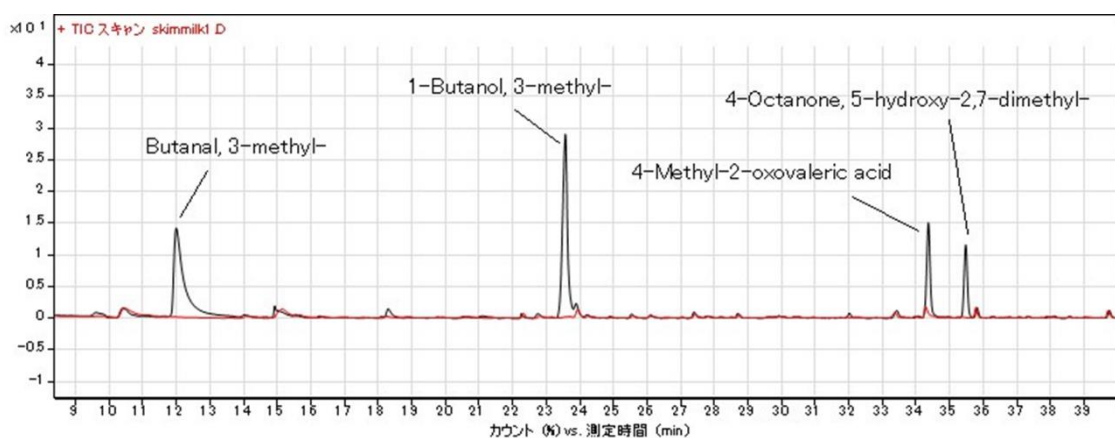


図2 還元脱脂乳およびAJ01株で発酵した発酵乳のGC/MSクロマトグラム

赤線：還元脱脂乳，黒線：AJ01株発酵乳

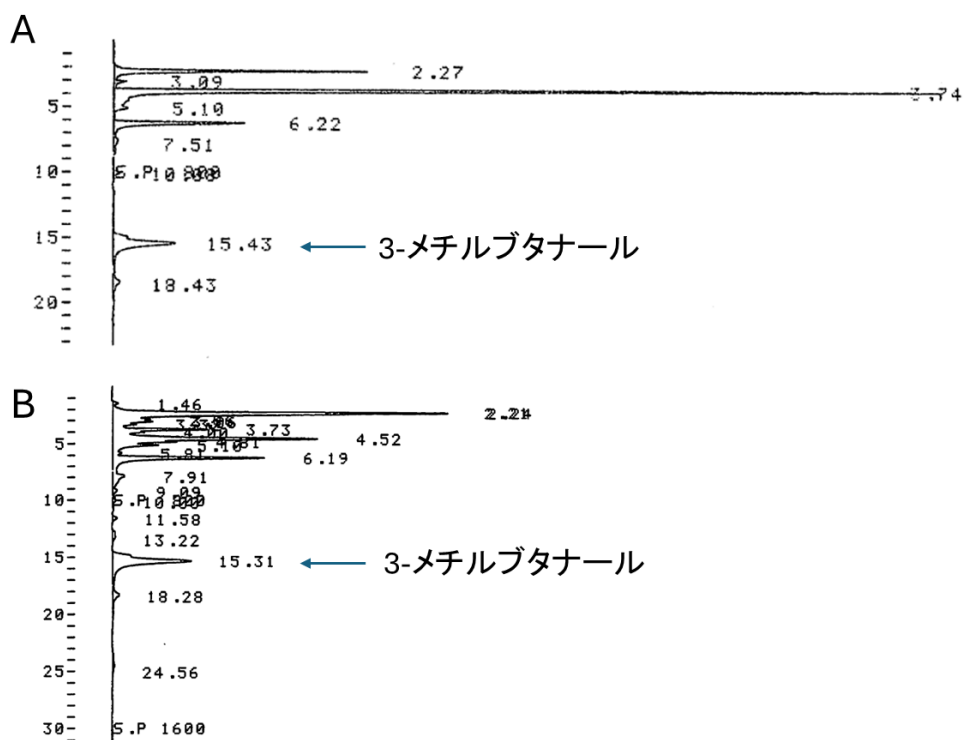


図3 検量線用試料溶液およびロイシンを添加した AJ01 株発酵乳のクロマトグラム

A：検量線用試料溶液のクロマトグラム

B：ロイシンを添加した AJ01 株発酵乳のクロマトグラム

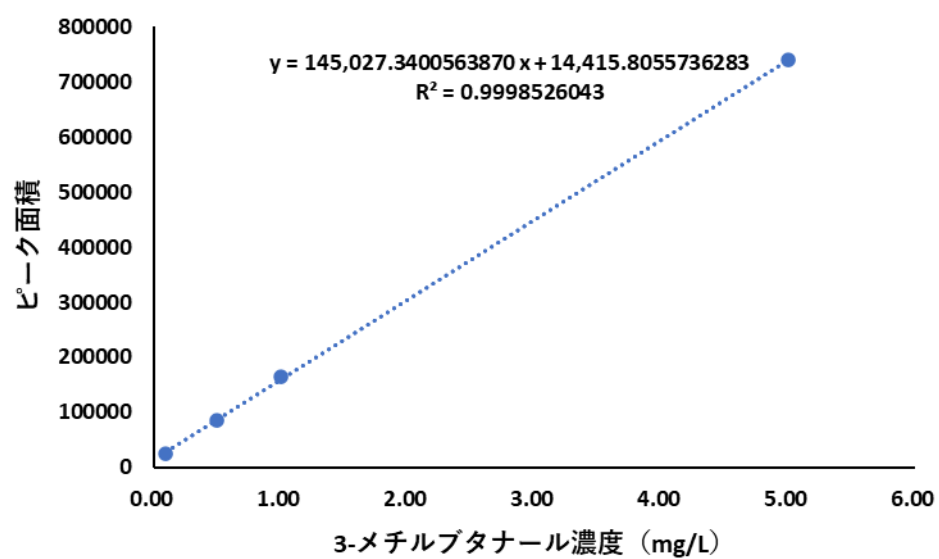


図4 HPLC で測定した 3-メチルブタノール検量線

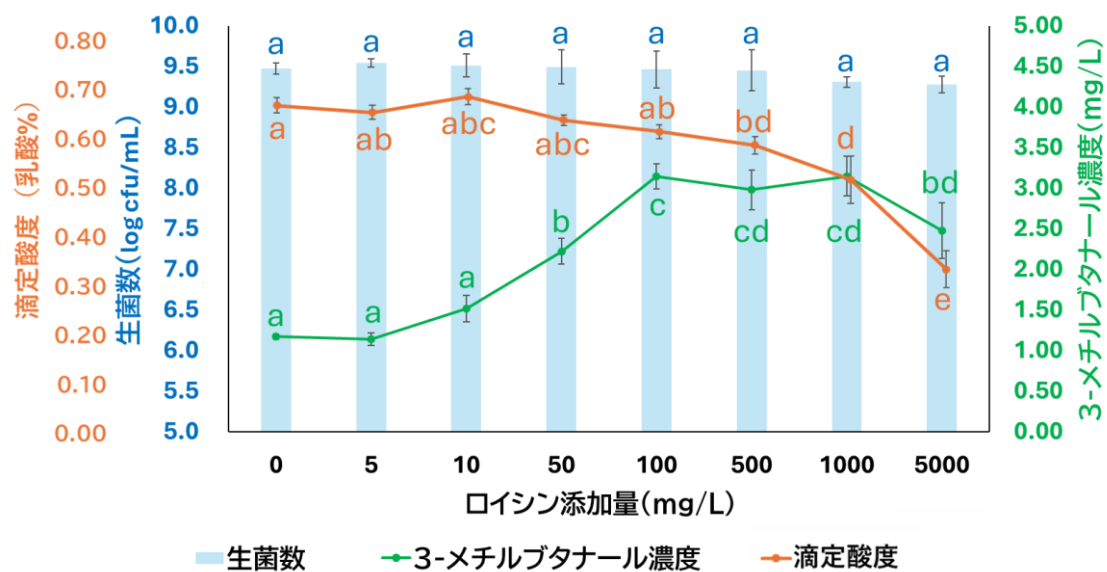


図5 ロイシンを添加し 18 時間発酵させた AJ01 株酸乳中の 3-メチルブタナール濃度，滴定酸度および生菌数

結果は 3 回以上測定した結果の平均±標準偏差を示す。

異なる記号は有意差があることを示す（補正 Tukey, $p < 0.05$ ）。

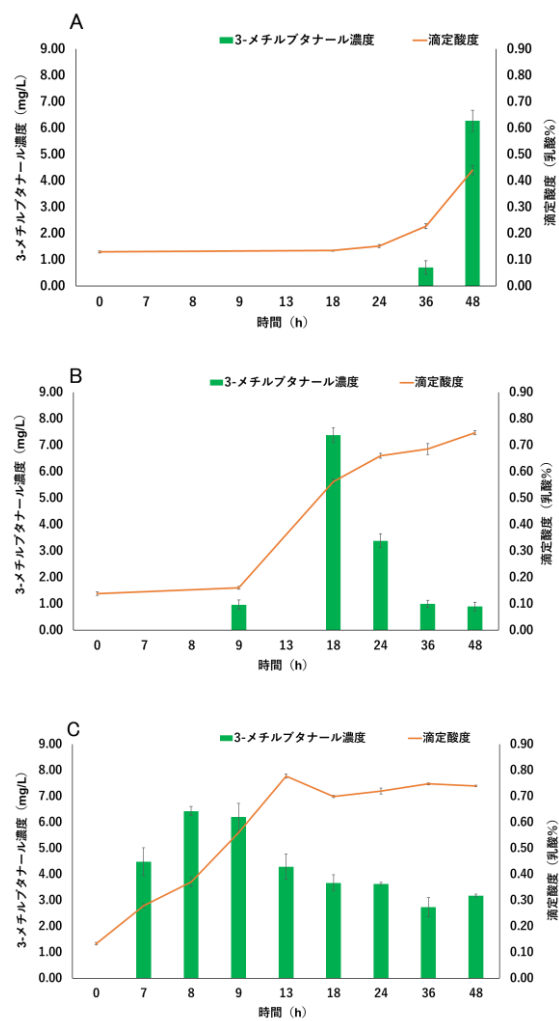


図6 ロイシンを 100 mg/L 添加した AJ01 株発酵乳において発酵温度 (A) 10°C, (B) 20°C

および (C) 30°C で 48 時間発酵させた場合の 3-メチルブタナール濃度および滴定酸度

結果は 3 回以上測定した結果の平均±標準偏差を示す。

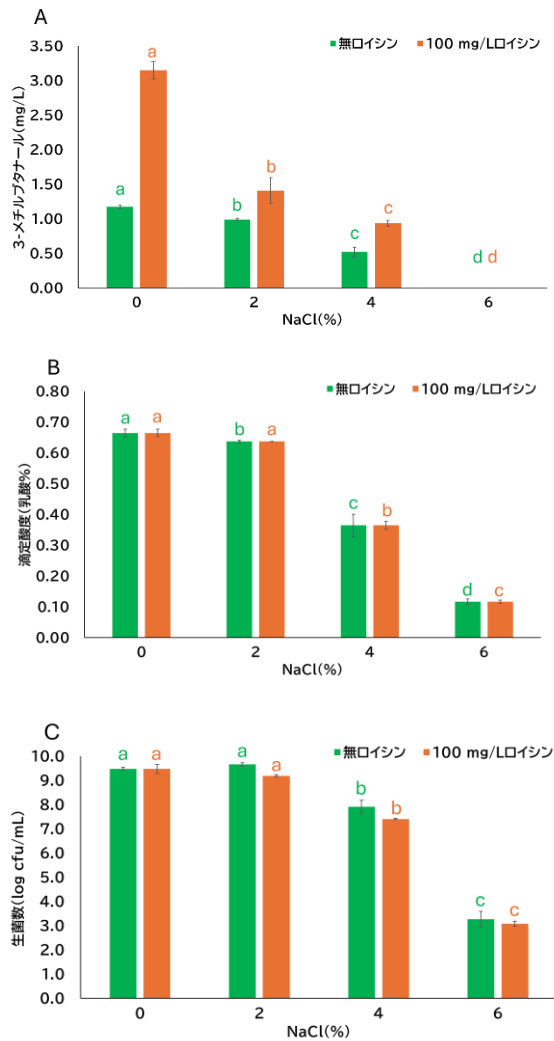


図7 ロイシン無添加, 100 mg/L ロイシン添加 AJ01 株発酵乳に NaCl を 0, 2, 4 および 6% 添加し, 30°C で 18 時間培養した場合の (A) 3-メチルブタナール濃度, (B) 滴定酸度および (C) 生菌数

結果は 3 回測定した結果の平均±標準偏差を示す。

種々の NaCl 濃度のロイシン無添加 AJ01 株酸乳間の異なる文字は有意差があることを示す (student の t 検定, $p < 0.05$)。

種々の NaCl 濃度の 100 mg/L ロイシン添加 AJ01 株酸乳間の異なる文字は有意差があることを示す (student の t 検定, $p < 0.05$)。

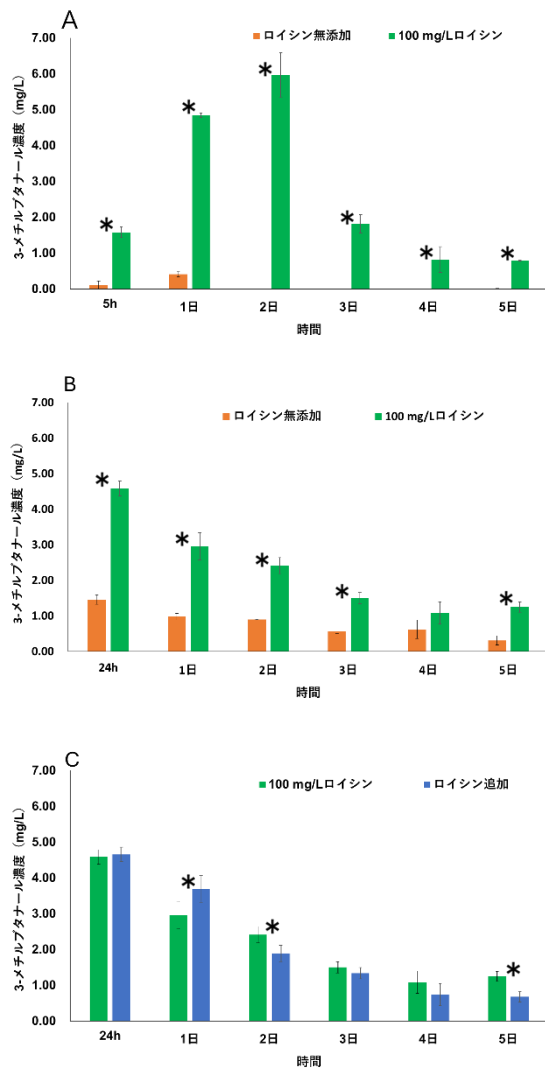


図8 AJ01 株酸乳保存中の 3-メチルブタナール濃度の推移

(A) 5 時間発酵させた場合の 3-メチルブタナール濃度の推移

(B) 24 時間発酵させた場合の 3-メチルブタナール濃度の推移

(C) 24 時間発酵させた後、ロイシン水溶液を追加で添加した場合の 3-メチルブタナール濃度の推移

*：同じ時間のロイシン無添加および 100 mg/L ロイシン添加間、100 mg/L ロイシン添加およびロイシン追加間の 3-メチルブタナール濃度に有意差があることを示す (student の t 検定, $p < 0.05$)

表1 本実験で使したプライマー

Gene	Primer	Sequence
<i>kdcA</i> (ケト酸デカルボキシラーゼ)	kdcA-forward	forward 5' AATTTCCATTGAGTCAAAACGAGAT 3'
	kdcA-reverse	reverse 5' CACGGTATCCGAAGTAAATAAAGC 3'
<i>pdhA</i> (ピルビン酸デヒドロゲナーゼE1- α)	pdhA-forward-1	forward-1 5' CTAAACAAGGACGTATGGGATT 3'
	pdhA-reverse-1	reverse-1 5' TCACGATAACCTGGGAAGAG 3'
	pdhA-forward-2	forward-2 5' AAGTGCCAAGCCAAGCAATG 3'
<i>pdhB</i> (ピルビン酸デヒドロゲナーゼE1- β)	pdhB-forward-1	forward-1 5' GTTGTAATGCCTTCAAATCCAG 3'
	pdhB-reverse-1	reverse-1 5' CATCAGATCCTTCTTTAGCGACT 3'
	pdhB-forward-2	forward-2 5' ATGCTCCTTCTGGCAATGCT 3'
<i>pdhC</i> (ピルビン酸デヒドロゲナーゼE2)	pdhC-forward	forward 5' TATGCACGCAAGGCTGGTATT 3'
	pdhC-reverse	reverse 5' GTTTGAGCGATAGGAGCGACA 3'
<i>pdhD</i> (ピルビン酸デヒドロゲナーゼE3)	pdhD-forward-1	forward-1 5' ATCGGTGATGTGGTTCCTGGTC 3'
	pdhD-reverse-1	reverse-1 5' CAGGCAAAGCAACGTGTAAGTCC 3'
	pdhD-reverse-2	reverse-2 5' TTTACCAAGTTCAGCCGCAC 3'

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (*pdh*) 複合体

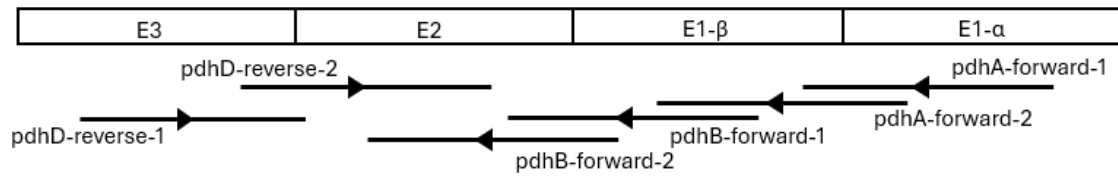
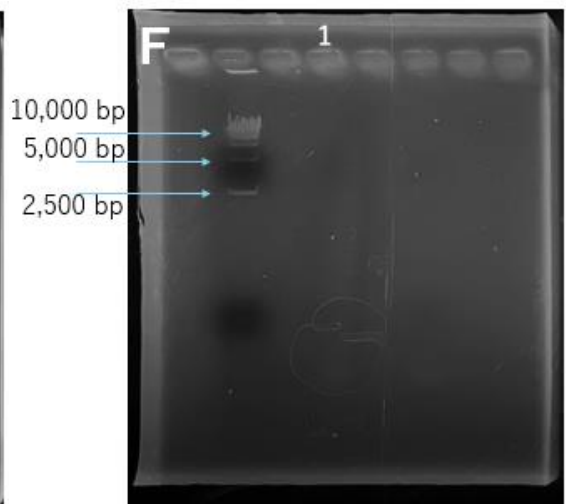
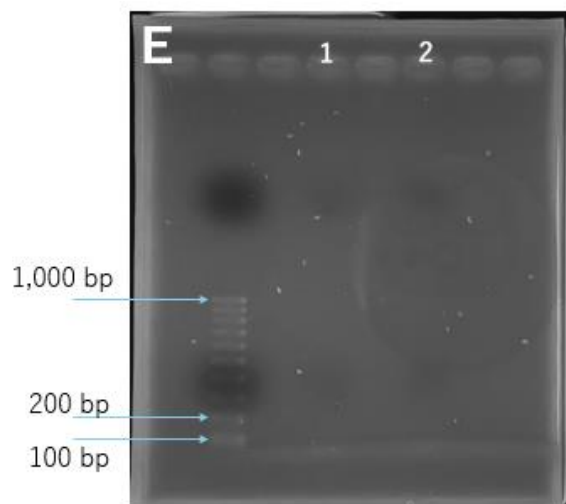
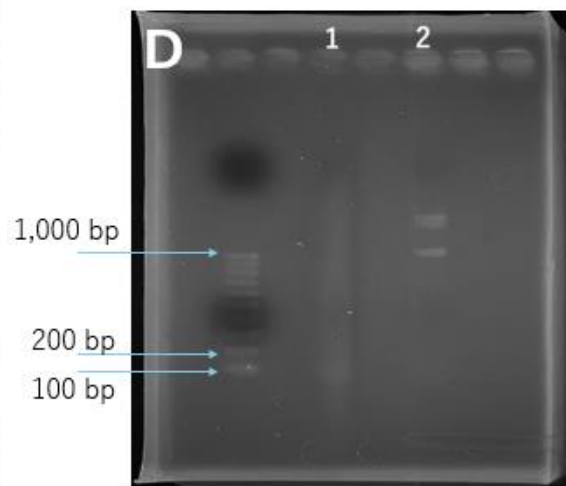
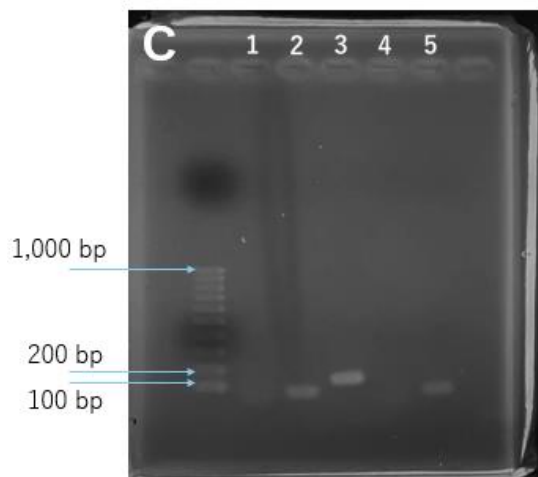
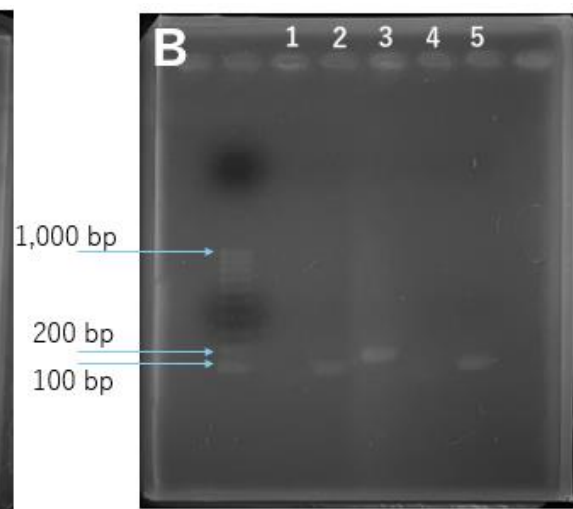
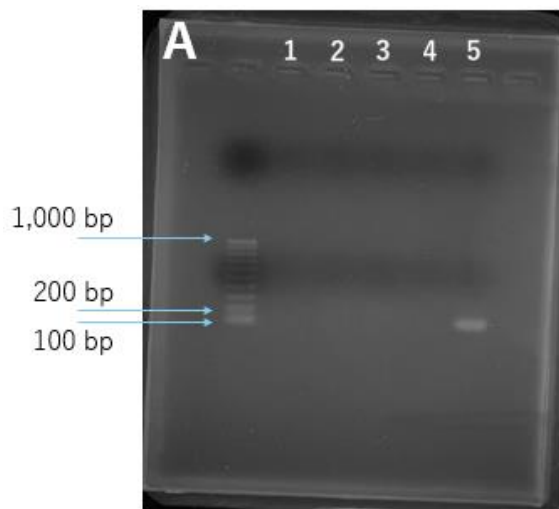


図9 *pdhA-forward-1* および *pdhD-reverse-1* を用いて行った PCR の産物を鋳型とした，塩基配列解析に用いたプライマーの位置

表 2 BSA 溶液と蒸留水の混合割合

BSA溶液	0 μL	50 μL	250 μL	500 μL	1000 μL
蒸留水	1000 μL	950 μL	750 μL	500 μL	0 μL



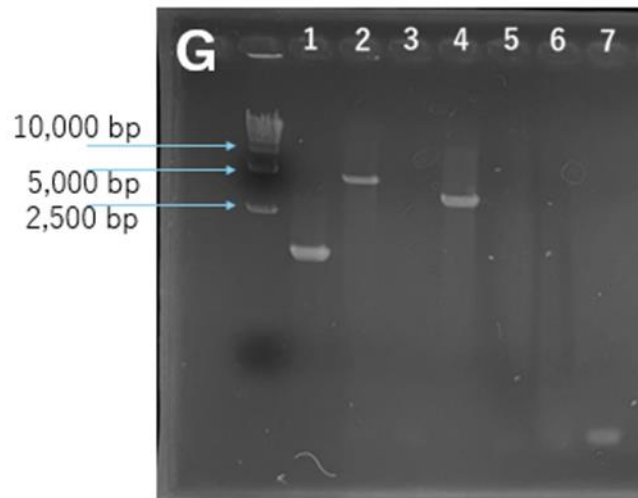


図 10 PCR で増幅した遺伝子のアガロースゲル電気泳動図

A : PCR 1 回目の結果

左端 : 100 bp ルーラー 1 : *kdcA* 2 : *pdhA* 3 : *pdhB* 4 : *pdhC* 5 : *pdhD*

B : PCR 2 回目の結果

左端 : 100 bp ルーラー 1 : *kdcA* 2 : *pdhA* 3 : *pdhB* 4 : *pdhC* 5 : *pdhD*

C : PCR 3 回目の結果

左端 : 100 bp ルーラー 1 : *kdcA* 2 : *pdhA* 3 : *pdhB* 4 : *pdhC* 5 : *pdhD*

D : PCR 4 回目の結果

左端 : 100 bp ルーラー 1 : *kdcA* 2 : *pdhC*

E : PCR 5 回目の結果

左端 : 100 bp ルーラー 1 : *kdcA* 2 : *pdhC*

F : PCR 6 回目の結果

左端 : 2.5 kbp ルーラー 1 : *pdhA*-forward-1 と *pdhD*-reverse-1

G : PCR 7 回目の結果

左端 : 2.5 kbp ルーラー

1 : *pdhA*-forward-1 と *pdhB*-reverse-1

2 : *pdhA*-forward-1 と *pdhD*-reverse-1

3 : *pdhB*-forward-1 と *pdhA*-reverse-1

4 : *pdhB*-forward-1 と *pdhD*-reverse-1

5 : *pdhD*-forward-1 と *pdhA*-reverse-1

6 : *pdhD*-forward-1 と *pdhD*-reverse-1

	pdhA-forward-1		
AJ01	-----CTAAACAAGGACGTATGGGATT	→E1- α TGCTGAAATAGGCTCAGCTTTTGCT	49
SK11	-----AAGAAGCTTCTCAAATGGCCTCAGCTTTTGCT		32
MG1363	ATGGGATTCTTTGGACCTCACGCTGGTCAAGAAGCTTCTCAAATGGCCTCAGCTTTTGCT		180
		** ***** *****	
	pdhA-reverse-1		
AJ01	TTCAGTATGAAGACTGGCTTTTCCCAGGTTATCGTGA	TTTGCCACAAATCTACGCTAAA	109
SK11	TTCAGTATGAAGACTGGCTTTTCCCAGGTTATCGTGA	TTTGCCACAAATCTACGCTAAA	92
MG1363	TTCAGTATGAAGACTGGCTTTTCCCAGGTTATCGTGA	TTTGCCACAAATCTACGCTAAA	240

AJ01	GGTTGGCCAATTTGGAAAGGGCTTCTTTGGTCTCGTGGACATCAACTTGGTAATGAATAT		169
SK11	GGTTGGCCAATTTGGAAAGGGCTTCTTTGGTCTCGTGGACATCAACTTGGTAATGAATAT		152
MG1363	GGTTGGCCAATTTGGAAAGGGCTTCTTTGGTCTCGTGGACATCAACTTGGTAATGAATAT		300

AJ01	ACCACTGATGATGGTAAACCTGTAAACTCATGGTTTCCACAAATTATTATCGGTGCTCAA		229
SK11	ACCACTGATGATGGTAAACCTGTAAACTCATGGTTTCCACAAATTATTATCGGTGCTCAA		212
MG1363	ACCACTGATGATGGTAAACCTGTAAACTCATGGTTTCCACAAATTATTATCGGTGCTCAA		360

AJ01	TACGTTGAGGCCGCTGGTGTAGCACTTGGACTTAAAAACGTAAAAAGATGCTGTAGCC		289
SK11	TACGTTGAGGCCGCTGGTGTAGCACTTGGACTTAAAAACGTAAAAAGATGCTGTAGCC		272
MG1363	TACGTTGAGGCCGCTGGTGTAGCACTCGGACTTAAAAACGTAAAAAGATGCTGTAGCC		420
	***** *****		
AJ01	TTCGTTTAACTGGAGATGGTGGTTCTTCAAGGGGACACTTATGAAGGAATCAACTTT		349
SK11	TTCGTTTAACTGGAGATGGTGGTTCTTCAAGGGGACACTTATGAAGGAATCAACTTT		332
MG1363	TTCGTTTAACTGGAGATGGTGGTTCTTCAAGGGGACACTTATGAAGGAATCAACTTT		480

AJ01	GCTGGTGCCTATAAAGCCCCACTTGTTGCCTTTATCCAAAACAATGGTTATGCCATTTG		409
SK11	GCTGGTGCCTATAAAGCCCCACTTGTTGCCTTTATCCAAAACAATGGTTATGCCATTTG		392
MG1363	GCTGGTGCCTATAAAGCCCCACTTGTTGCCTTTATCCAAAACAATGGTTATGCCATTTG		540

AJ01	ACTCCTCGTAGCCTACAAAGTGCTGCTCCTCATTTGGCCGCTAAAGTTGGGCTGCCGGC		469
SK11	ACTCCTCGTAGCCTACAAAGTGCTGCTCCTCATTTGGCCGCTAAAGTTGGGCTGCCGGC		452
MG1363	ACTCCTCGTAGCCTACAAAGTGCTGCTCCTCATTTGGCCGCTAAAGTTGGGCTGCCGGC		600
	***** *****		
AJ01	GCTCCGTCTATCGTTGTTGATGGAATGGACGCAATTGCCATGTATCTTGCTTCTAAAGAA		529
SK11	GCTCCGTCTATCGTTGTTGATGGAATGGACGCAATTGCCATGTATCTTGCTTCTAAAGAA		512

MG1363	GCTCCGTCATCGTTGTTGATGGAATGGACGCAATTGCCATGTATCTTGCTTCTAAAGAA	660

AJ01	GCTCGTGCTTGGGCAGTAGCTGGAAATGGTCCGTTGTTATTGAAGCTATTACAAACCGT	589
SK11	GCTCGTGCTTGGGCAGTAGCTGGAAATGGTCCGTTGTTATTGAAGCTATTACAAACCGT	572
MG1363	GCTCGTGCTTGGGCAGTAGCTGGAAATGGTCCGTTGTTATTGAAGCTATTACAAACCGT	720

AJ01	CTTGAACCCATTCAACGGCTGGTGATGACCCACTTCGCTATCGTACTAAAGAAGATATT	649
SK11	CTTGAACCCATTCAACGGCTGGTGATGACCCACTTCGCTATCGTACTAAAGAAGATATT	632
MG1363	CTTGAACCCATTCAACGGCTGGTGATGACCCACTTCGCTATCGTACTAAAGAAGATATT	780

AJ01	GAAGCTTGGTGAAAAAAGAACCACTCGTTCGTATGCGTAATTTCTTAAC ^{→E1-β} CTGAAAAAGGA	709
SK11	GAAGCTTGGTGAAAAAAGAACCACTCGTTCGTATGCGTAATTTCTTAAGTAAAAAGGA	692
MG1363	GAAGCTTGGTGAAAAAAGAACCACTCGTCCGTATGCGTAATTTCTTAAGTAAAAAGGA	840

AJ01	CTTTGGGATACAGATAAAGAAGAAGCTTATGTTGCTGAGCTTGATGCACGTATTGATGCT	769
SK11	CTTTGGGATACAGATAAAGAAGAAGCTTATGTTGCTGAGCTTGATGCACGTATTGATGCT	752
MG1363	CTTTGGGATACAGATAAAGAAGAAGCTTATGTTGCTGAGCTTGATGCACGTATTGATGCT	900

AJ01	GATATCAAGAAAGCAAATAATGTTGAAAAACAAAAATTTCAAGCTTCATTAATAATACA	829
SK11	GATATCAAGAAAGCAAATAATGTTGAAAAACAAAAATTTCAAGCTTCATTAATAATACA	812
MG1363	GATATCAAGAAAGCAAATAATGTTGAAAAACAAAAATTTCAAGCTTCATTAATAATACA	960

AJ01	CTTGAAGTGCCAAGCCAAGCAATGGCAGAACAAATTGCAAAATTTGAAAGCGAGGGC-AA	888
SK11	CTTGAAGTGCCAAGCCAAGCAATGGCAGAACAAATTGCAAAATTTGAAAGCGAGGGCAAA	872
MG1363	CTTGAAGTGCCAAGCCAAGCAATGGCAGAACAAATTGCAAAATTTGAAAGCGAGGGCAAA	1020

AJ01	TAAGAATGGCAGTAAAACTTATATTGCAGCAATTACAGAAG ^{←E1-α} CGCTTGATTGGCGCTTG	948
SK11	TAAGAATGGCAGTAAAACTTATATTGCAGCAATTACAGAAGCGCTTGATTGGCGCTTG	932
MG1363	TAAGAATGGCAGTAAAACTTATATTGCAGCAATTACAGAAGCGCTTGATTGGCGCTTG	1080

AJ01	AAAAAGACAAAGATGCACTCATTTTTGGTGAAGACGTCGGACAAAATGGTGGGGTTTTCC	1008
SK11	AAAAAGACAAAGATGCACTCATTTTTGGTGAAGACGTCGGACAAAATGGTGGGGTTTTCC	992
MG1363	AAAAAGACAAAGATGCACTCATTTTTGGTGAAGACGTCGGACAAAATGGTGGGGTTTTCC	1140

AJ01	GTGCCACTGACGACTTCAAGCAAAATATGGTGAAGACCGGTTTTCAATACTCCACTCG	1068
SK11	GTGCCACTGACGACTTCAAGCAAAATATGGTGAAGACCGGTTTTCAATACTCCACTCG	1052

MG1363	GTGCCACTGACGGACTTCAAGCAAAATATGGTGAAGACCGGTTTTCAATACTCCACTCG	1200

AJ01	CAGAATCAGGAATTGGTGAATGGCAATCGGTCTTGCAACACAAGGTTCCACCCAATTA	1128
SK11	CAGAATCAGGAATTGGTGAATGGCAATCGGTCTTGCAACACAAGGTTCCACCCAATTA	1112
MG1363	CAGAATCAGGAATTGGTGAATGGCAATGGTCTTGCAACACAAGGTTCCACCCAATTA	1260

AJ01	TGGAAATCCAATTCGGGACCTTTATCTTTGAAGTTTTCGACTCAATTGCTGGACAAATGA	1188
SK11	TGGAAATCCAATTCGGGACCTTTATCTTTGAAGTTTTCGACTCAATTGCTGGACAAATGA	1172
MG1363	TGGAAATCCAATTCGGGACCTTTATCTTTGAAGTTTTCGACTCAATTGCTGGACAAATGA	1320

AJ01	GCCGGACACGTTATCGTTTTAATAACACTCGTTCAAATAATATTGTCGTGCGTACGCCTT	1248
SK11	GCCGGACACGTTATCGTTTTAATAACACTCGTTCAAATAATATTGTCGTGCGTACGCCTT	1232
MG1363	GCCGGACACGTTATCGTTTTAATAACACTCGTTCAAATAATATTGTCGTGCGTACGCCTT	1380

AJ01	ATGGTATCGGAACATAAACACCTGAAATGCATGCTGATTCAATCGAAGGATTGTTTTAC	1308
SK11	ATGGTATCGGAACATAAACACCTGAAATGCATGCTGATTCAATCGAAGGATTGTTTTAC	1292
MG1363	ATGGTATCGGAACATAAACACCTGAAATGCATGCTGATTCAATCGAAGGATTGTTTTAC	1440

pdhB-forward-1		
AJ01	AACTCCCTGGGGTACGTGTGGTTATGCCTTCAAATCCAGCGGATGCTAAAGGTTTGCTAC	1368
SK11	AACTCCCTGGGGTACGTGTGGTTATGCCTTCAAATCCAGCGGATGCTAAAGGTTTGCTAC	1352
MG1363	AACTCCAGGGGTACGTGTGGTTATGCCTTCAAATCCAGCGGATGCTAAAGGTTTGCTAC	1500

AJ01	TCGCATCAATTGAAAATAATGACCCTGTTATTTTCCTTGAAAACCTCCACCTTTACCGTT	1428
SK11	TCGCATCAATTGAAAATAATGACCCTGTTATTTTCCTTGAAAACCTCCACCTTTACCGTT	1412
MG1363	TCGCATCAATTGAAAATAATGACCCTGTTATTTTCCTTGAAAACCTCCACCTTTACCGTT	1560

pdhB-reverse-1		
AJ01	CATTAAGGTTGAAGTTCCTGAGGGTACTACACAACACCGCTTGACCAAGCAGCCGTCG	1488
SK11	CATTAAGGTTGAAGTTCCTGAGGGTACTACACAACACCGCTTGACCAAGCAGCCGTCG	1472
MG1363	CATTAAGGTTGAAGTTCCTGAGGGTACTACACAACACCGCTTGACCAAGCAGCCGTCG	1620

AJ01	CTAAAGAAGGTTCTGATGTTTCAATCATTGCTTATGGTGGAAGTTCCTCTTGCTCTCA	1548
SK11	CTAAAGAAGGTTCTGATGTTTCAATCATTGCTTATGGTGGAAGTTCCTCTTGCTCTCA	1532
MG1363	CTAAAGAAGGTTCTGATGTTTCAATCATTGCTTATGGTGGAAGTTCCTCTTGCTCTCA	1680

AJ01	AAGCTGCTGAACAACCTTGAAAAAGATGGAATCAAAGCTGAAGTTATTGACCTTAGAAGT	1608
SK11	AAGCTGCTGAACAACCTTGAAAAAGATGGAATCAAAGCTGAAGTTATTGACCTTAGAAGT	1592

MG1363	AAGCTGCTGAACAACCTTGAAAAAGATGGAATCAAAGCTGAAGTTATTGACCTTAGAACTG	1740

AJ01	TTGCTCCTCTTGACATCGCATCAATCGGTAAACAGTTGAAAAACTGGACGTGTTGTTG	1668
SK11	TTGCTCCTCTTGACATCGCATCAATCGGTAAACAGTTGAAAAACTGGACGTGTTGTTG	1652
MG1363	TTGCTCCTCTTGACATCGCATCAATCGGTAAACAGTTGAAAAACTGGACGTGTTGTTG	1800

AJ01	TTGTTCAAGAAGCTCAACGTACCGCTGGTATTGCGGCAAATGTAATGGCTGAAATTTAG	1728
SK11	TTGTTCAAGAAGCTCAACGTACCGCTGGTATTGCGGCAAATGTAATGGCTGAAATTTAG	1712
MG1363	TTGTTCAAGAAGCTCAACGTACCGCTGGTATTGCGGCAAATGTAATGGCTGAAATTTAG	1860

AJ01	AACGTTTTGTCTTGAATCTTAAAGCACCTATTGGACGCGTAACGGTCCAGACTCAATTT	1788
SK11	AACGTTTTGTCTTGAATCTTAAAGCACCTATTGGACGCGTAACGGTCCAGACTCAATTT	1772
MG1363	AACGTTTTGTCTTGAATCTTAAAGCACCTATTGGACGCGTAACGGTCCAGACTCAATTT	1920

AJ01	TCCCATTGCGACAAGCGGAAAATGATTGGGCGAGTTAAAGCTGAGGATATCGTGA ^{→E2} ATAAG	1848
SK11	TCCCATTGCGACAAGCGGAAAATGATTGGGCGAGTTAAAGCTGAGGATATCGTGAATAAG	1832
MG1363	TCCCATTGCGACAAGCGGAAAATGATTGGGCGAGTTAAAGCTGAAGATATCGTGAATAAG	1980

AJ01	TAAAGAGGTGGTTGATTAT ^{←E1-β} GACTGAGATTTTAAATGCCTGATATTGGCGAAGGAATG	1908
SK11	TAAAGAGGTGGTTGATTATGACTGAGATTTTAAATGCCTGATATTGGCGAAGGAATG	1892
MG1363	TAAAGAGGTGGTTGATTATGACTGAGATTTTAAATGCCTGATATTGGCGAAGGAATG	2040

AJ01	CACGAAGGGGACATTGCCAACTGGTTAGTTAAAGTTGGAGATGTTGTTAAAGAAGATGAT	1968
SK11	CACGAAGGGGACATTGCCAACTGGTTAGTTAAAGTTGGAGATGTTGTTAAAGAAGATGAT	1952
MG1363	CACGAAGGGGACATTGCCAACTGGTTAGTTAAAGTTGGAGATGTTGTTAAAGAAGATGAT	2100

AJ01	CCAATTGCTGAAGTACAAAATGATAAACTCATGCAAGAAATTCTCTCCCTACTCTGGG	2028
SK11	CCAATTGCTGAAGTACAAAATGATAAACTCATGCAAGAAATTCTCTCCCTACTCTGGG	2012
MG1363	CCAATTGCTGAAGTACAAAATGATAAACTCATGCAAGAAATTCTCTCCCTACTCTGGG	2160

AJ01	ACTGTAACAAAACCTTCGTTGAAGAAGGAACAACCTGTAGAAGTTGATTCTCCTTTGGTT	2088
SK11	ACTGTAACAAAACCTTCGTTGAAGAAGGAACAACCTGTAGAAGTTGATTCTCCTTTGGTT	2072
MG1363	ACTGTAACAAAACCTTCGTTGAAGAAGGAACAACCTGTAGAAGTTGATTCTCCTTTGGTT	2220

AJ01	GAGTTTGATGGAGACGCTTCAGGAACCTTGCAGCTGCT-----CCTTCCGCTCAAGAA	2142
SK11	GAGTTTGATGGAGACGCTTCAGGAACCTTGCAGCTGCT-----CCTTCCGCTCAAGAA	2126

MG1363	GAGTTTGATGGAGACGGGTCAGGAACCTTCTGCAGCTGCTCCTGCTCCTGCCGCTCAAGAA	2280

AJ01	ACAGCAAGTTCTGATGCTCCTTCTGGCAATGCTCAAATCTTCACCATGCCTGATATTGGT	2202
SK11	ACAGCAAGTTCTGATGCTCCTTCTGGCAATGCTCAAATCTTCACCATGCCTGATATTGGT	2186
MG1363	ACAGTAAGTTCTGATGCTCCTTCTGGCAATGCTCAAATCTTCACCATGCCTGATATTGGT	2340

AJ01	GAAGGAATGCATGAAGGCGATATTGCCAACTGGCTCGTTAAAGTTGGAGATGAAATTTAA	2262
SK11	GAAGGAATGCATGAAGGCGATATTGCCAACTGGCTCGTTAAAGTTGGAGATGAAATTTAA	2246
MG1363	GAAGGAATGCATGAAGGCGATATTGCCAACTGGCTCGTTAAAGTTGGAGATGAAATTTAA	2400

AJ01	GAAGATGATCCTGTTGCAGAAGTTCAAACGATAAACTCATGCAAGAGATTCTTCTCCT	2322
SK11	GAAGATGATCCTGTTGCAGAAGTTCAAACGATAAACTCATGCAAGAGATTCTTCTCCT	2306
MG1363	GAAGATGATCCTGTTGCAGAGGTTCAAACGATAAACTCATGCAAGAGATTCTTCTCCT	2460

AJ01	TACTCTGGAAGTCACAAAACCTTTTCGTGGAAGCAGGAACAACGTAGAAGTTGGTGCT	2382
SK11	TACTCTGGAAGTCACAAAACCTTTTCGTGGAAGCAGGAACAACGTAGAAGTTGGTGCT	2366
MG1363	TACTCTGGAAGTCACTAAACCTTTTCGTGGAAGCAGGAACAACGTAGAAGTTGGGGCC	2520

AJ01	CCTTTGATTGAATACAATGGAATGGTGAATCTTCAAGTAATCCTGCTCCTGCTGCTAGT	2442
SK11	CCTTTGATTGAATACAATGGAATGGTGAATCTTCAAGTAATCCTGCTCCTGCTGCTAGT	2426
MG1363	CCTTTGATTGAATACAATGGAATGGTGAATCTACAAGTAATCCTGCTCCTGCTGCTAGT	2580

AJ01	CCTGCGCAATTGCGGAAGCTCATAAAGCAGCCGCTGCACCTACTGATGCGCCATTGACA	2502
SK11	CCTGCGCAATTGCGGAAGCTCCTAAAACAGCCGCTGCACCTACTGATGCGCCATTGACA	2486
MG1363	CCTGCTCAATTGCGGAAGCTCCTAAAAGCAGCCGCTGCACCTACTGATGCGCCATTGACA	2640

AJ01	AAAACAACCTTCTACTGGACATATTCTTGCTATGCCATCTGTCCGTCATTATGCTCGTAAA	2562
SK11	AAAACAACCTTCTACTGGACATATTCTTGCTATGCCATCTGTCCGTCATTATGCTCGTAAA	2546
MG1363	AAAACAACCTTCTACTGGACATATTCTTGCTATGCCATCTGTCCGTCATTATGCTCGTAAA	2700

AJ01	GCGGGAATTGATTTAACTCAAGTACCTGCAACTGGTCGTATGGGCATACAACCTTTGGCT	2622
SK11	GCGGGAATTGATTTGACTCAAGTACCTGCAACTGGTCGTATGGGCATACAACCTTTGGCT	2606
MG1363	GCGGGAATTGATTTAACTCAAGTACCTGCAACTGGTCGTATGGGCATACAACCTTTGGCT	2760

AJ01	GACGTTAAAGCTTTTGAATCTGGTAGCGTTGCACCAATTGCTCCTGTGGCTCCAGAATCA	2682
SK11	GACGTTAAAGCTTTTGAATCTGGTAGCGTTGCACCAATTGCTCCTGTGGCTCCAGAATCA	2666

MG1363	GACGTTAAAGCTTTTGAATCTGGTAGCGTTGCACCAATCGCTCCTGTGGCTCCAGAATCA	2820

AJ01	GCTCCTGTGGCACCTGCGCCTAAAGCTGATAAAGCTACGAAAAAGCCCCAACTGTAAAA	2742
SK11	GCTCCTGTGGCACCTGCGCCTAAAGCTGATAAAGCTACGAAAAAGCCCCAACTGTAAAA	2726
MG1363	GCTCCTGTGGCACCTGCGCCTAAAGCCGATAAAGCTACGAAAAAGCCCCAACTGTAAAA	2880

AJ01	TCTGTGGCTGGAGATCGTCGTGAAGCAATGAATCCAACCTCGTAAAGTTGTTTCTAAAGTT	2802
SK11	TCTGTGGCTGGAGATCGTCGTGAAGCAATGAATCCAACCTCGTAAAGTTGTTTCTAAAGTT	2786
MG1363	TCTGTGGCTGGAGATCGTCGTGAAGCAATGAATCCAACCTCGTAAAGTTGTTTCTAAAGTT	2940

AJ01	ATGACTGCTCAACACACTCATATTCCACCAGTAACAACTTTGATCAAGTGGAAGTTTCT	2862
SK11	ATGACTGCTCAACACACTCATATTCCACCAGTAACAACTTTGATCAAGTGGAAGTTTCT	2846
MG1363	ATGACTGCTCAACACACTCATATTCCACCAGTAACAACTTTGATCAAGTGGAAGTTTCT	3000

AJ01	AAACTTGTTAAACATCGCGCCGTCTTCAAAGAAGTAGCAGCAAAACAAGATATCAAATTG	2922
SK11	AAACTTGTTAAACATCGCGCCGTCTTCAAAGAAGTAGCAGCAAAACAAGATATCAAATTG	2906
MG1363	AAACTTGTTAAACATCGCGCCGTCTTCAAAGAAGTAGCAGCAAAACAAGATATCAAATTG	3060

AJ01	ACTTACCTTGCTTATGTTGCTAAAGCCTTGGAACCTACTGCTCATAAGTTTCCAGAAATT	2982
SK11	ACTTACCTTGCTTATGTTGCTAAAGCCTTGGAACCTACTGCTCATAAGTTCCAGAAATT	2966
MG1363	ACTTACCTTGCTTATGTTGCTAAAGCCTTGGAACCTACTGCTCATAAGTTCCAGAAATT	3120

AJ01	AATGCTTCTGTTGACTATGATAAGCAAGAAATTGTTTATCATGAACATGTCAACCTCGGG	3042
SK11	AATGCTTCTGTTGACTATGATAAGCAAGAAATTGTTTATCATGAACATGTCAACCTCGGG	3026
MG1363	AATGCTTCTGTTGACTATGATAAGCAAGAAATTGTTTATCATGAACATGTCAACCTCGGG	3180

AJ01	ATTGCTGTAAATGCCCAACTGGTTTATATGTCCAGTCATTATGAAGCTGAAACTAAA	3102
SK11	ATTGCTGTAAATGCCCAACTGGTTTATATGTCCAGTCATTATGAAGCTGAAACTAAA	3086
MG1363	ATTGCTGTAAATGCCCAACTGGTTTATATGTCCAGTCATTATGAAGCTGAAACTAAA	3240

AJ01	TCAATCCTTGAAATTGCAAAAGAAATTGTTGAATTAGCGACTGCTACACGTGAAGGAACG	3162
SK11	TCAATCCTTGAAATTGCAAAAGAAATTGCTGAATTAGCGACTGCTACACGTGAAGGAACG	3146
MG1363	TCAATCCTTGAAATTGCAAAAGAAATTGCTGAATTAGCGACTGCTACACGTGAAGGAACA	3300

AJ01	CTTAAACCTCAACAAATGCAAGGCTCAACGATTACAATTTCAAATATTGGTTCGCTCGT	3222
SK11	CTTAAACCTCAACAAATGCAAGGCTCAACGATTACAATTTCAAATATTGGTTCGCTCGT	3206

MG1363	CTTAAACCTCAACAAATGCAAGGTTCAACGATTACAATTTCAAATATTGGTCTGCTCGT	3360

AJ01	GGTTCCTGGTTTACACCAATCATCAACGGTCTGATGTTGTGATTTTAGGTTGGGTTCA	3282
SK11	GGTTCCTGGTTTACACCAATCATCAACGGTCTGATGTTGTGATTTTAGGTTGGGTTCA	3266
MG1363	GGTTCCTGGTTTACACCAATCATCAACGGTCTGATGTTGTGATTTTAGGTTGGGTTCA	3420

AJ01	ATTGTTAAAGAACCAATTGTCAATGGTGAAGGTGAAATTGTCGTAGGACAAAACATGAAA	3342
SK11	ATTGTTAAAGAACCAATTGTCAATGGTGAAGGTGAAATTGTCGTAGGACAAAACATGAAA	3326
MG1363	ATTGTTAAAGAACCAATTGTCAATGGTGAAGGTGAAATTGTCGTAGGACAAAACATGAAA	3480

AJ01	TTGTCTATGACTTATGACCACCGTTTGATTGATGGTATGTTGGGTCAAACATCACTTAAC	3402
SK11	TTGTCTATGACTTATGACCACCGTTTGATTGATGGTATGTTGGGTCAAACATCACTTAAC	3386
MG1363	TTGTCTATGACTTATGACCACCGTTTGATTGATGGTATGTTGGGTCAAACATCACTTAAC	3540

AJ01	TACTTGAAATCACTTTTGGCTGACCCTGAGTTCATGCTTATGGAATTAATACGATGTA	3462
SK11	TACTTGAAATCACTTTTGGCTGACCCTGAGTTCATGCTTATGGAATTAATACGATGTA	3446
MG1363	TACTTGAAATCACTTTTGGCTGACCCTGAGTTCATGCTTATGGAATTAATACGATGTA	3600

AJ01	ATGAATGGTGCTGAATCCCCTATTCAATACACGCGAATTCCTAACGGACATTCGCTAATC	3522
SK11	ATGAATGGTGCTGAATCCCCTATTCAATACACGCGAATTCCTAACGGACATTCGCTAATC	3506
MG1363	ATGAATGGTGCTGAATCCCCTATTCAATACACGCGAATTCCTAACGGACATTCGCTAATC	3660

AJ01	GTCTTATTAGAAAACCTTATGAAAAAATATCGTTTTTCATAAGTTTCCGTCATAGTTTTTAA	3582
SK11	GTCTTATTAGAAAACCTTATGAAAAAATATCGTTTTTCATAAGTTTCCGTCATAGTTTTTAA	3566
MG1363	GTCTTATTAGAAAACCTTATGAAAAAATATCGTTTTTCATAAGTTTCCGTCATAGTTTTTAA	3720

AJ01	ATAAAATTCCTAGGACAAGTCTGTCAGTAAGTTTACAACGTTGTAAACCCTAGTTGACAT	3642
SK11	ATAAAATTCCTAGGACAAGTCTGTCAGTAAGTTTACAACGTTGTAAACCCTAGTTGACAT	3626
MG1363	ATAAAATTCCTAGGACAAGTCTGTCAGTAAGTTTACAACGTTGTAAACCCTAGTTGACAT	3780

AJ01	TGAAGTTTACAAGAAAAGAGGAATAAATAATGGTTGTTGGTGCACAAGCAACAGAAGTTG	3702
SK11	TGAAGTTTACAAGAAAAGAGGAATAAATAATGGTTGTTGGTGCACAAGCAACAGAAGTTG	3686
MG1363	TGAAGTTTACAAGAAAAGAGGAATAAATAATGGTTGTTGGTGCACAAGCAACAGAAGTTG	3840

AJ01	ATTTGGTTGTTATTGGTTCAGGCCCTGGCGGTTATGTTGCGGCCATCCGTGCGGCTGAAC	3762
SK11	ATTTGGTTGTTATTGGTTCAGGCCCTGGCGGTTATGTTGCGGCCATCCGTGCGGCTGAAC	3746

MG1363	ATTTGGTTGTTATTGGTTCAGGCCCTGGCGGTTATGTTGCGGCCATCCGTGCGGCTGAAC	3900

AJ01	TTGGTAAAAAGTTACGATTATTGAAAAAGATAATGTCGGTGGGGTTTGTTTAAATATTG	3822
SK11	TTGGTAAAAAGTTACGATTATTGAAAAAGATAATGTCGGTGGGGTTTGTTTAAATATTG	3806
MG1363	TTGGTAAAAAGTTACGATTATTGAAAAAGATAATGTCGGTGGGGTTTGTTTAAATATTG	3960

AJ01	GATGTATCCCATCAAAGCATTGATTAATATCGGTCATCATTATCAAGAATCTTTGGAAG	3882
SK11	GATGTATCCCATCAAAGCATTGATTAATATCGGTCATCATTATCAAGAATCTTTGGAAG	3866
MG1363	GATGTATCCCATCAAAGCATTGATTAATATTGGTCATCATTATCAAGAATCTTTGGAAG	4020

AJ01	AAGAAAAGGGCGAAAATCCTTTTGGACTTTCTGTCGGAAATGTTAAATTAACTGGGAAT	3942
SK11	AAGAAAAGGGCGAAAATCCTTTTGGACTTTCTGTCGGAAATGTTAAATTAACTGGGAAT	3926
MG1363	AAGAAAAGGGTGA AAAATCCTTTTGGACTTTCTGTCGGAAATGTTAAATTAAATTGGGAAT	4080

AJ01	CTGCCCAAAAATGGAACAAGATAAAGTTGTCAACCAGTTGACTGGTGGCGTTAAATGC	4002
SK11	CTGCCCAAAAATGGAACAAGATAAAGTTGTCAACCAGTTGACTGGTGGCGTTAAATGC	3986
MG1363	CTGCCCAAAAATGGAACAAGATAAAGTTGTCAACCAGTTGACAGTGGCGTTAAATGC	4140

AJ01	TACTTAAAAACACAAAGTTGACGTAATTC AAGGAACAGCTGAGTTTATTGATAACAATA	4062
SK11	TACTTAAAAACACAAAGTTGACGTAATTC AAGGAACAGCTGAGTTTATTGATAACAATA	4046
MG1363	TACTTAAAAACACAAAGTTGATGTAATTC AAGGAACAGCTGAGTTTATTGATAACAATA	4200

AJ01	CAATCAATGTTGAACAAGAAGATGGTTTCCAAC TTTTGCAGTTCAACGATGTAATTATCT	4122
SK11	CAATCAATGTTGAACAAGAAGATGGTTTCCAAC TTTTGCAGTTCAACGATGTAATTATCT	4106
MG1363	CAATCAATGTTGAACAAGAAGATGGTTTCCAAC TTTTGCAGTTCAACGATGTAATTATCT	4260

AJ01	CAACTGGTTCACGTCCTATTGAAATCCCATCTTTCCCATTTGGTGGTCGTATTATTGACT	4182
SK11	CAACTGGTTCACGTCCTATTGAAATCCCATCTTTCCCATTTGGTGGTCGTATTATTGACT	4166
MG1363	CAACTGGTTCACGTCCTATTGAAATCCCATCTTTCCCATTTGGTGGTCGTATTATTGACT	4320

AJ01	CAACAGGTGCTTTGTCACTTCCAGAAGTGCCTAAACATTTGATTATTGTTGGGGTGGCG	4242
SK11	CAACAGGTGCTTTGTCACTTCCAGAAGTGCCTAAACATTTGATTATTGTTGGGGTGGCG	4226
MG1363	CAACAGGTGCTTTGTCACTTCCAGAAGTGCCTAAACATTTGATTATTGTTGGGGTGGCG	4380

AJ01	TTATTGGTTCTGAGCTTGGTGGAGCTTACCGCATGCTCGGTTCTAAGATTACAATTGTTG	4302
SK11	TTATTGGTTCTGAGCTTGGTGGAGCTTACCGCATGCTCGGTTCTAAGATTACAATTGTTG	4286

MG1363	TTATTGGTCTGAGCTTGGTGGAGCTTACCGCATGCTCGGTTCTAAGATTACAATTGTTG	4440

AJ01	AAGGCTTGGACCACATTTTAAACGGTTTTGATAAAGAAATGTCTGATATCATTGCGAATC	4362
SK11	AAGGCTTGGACCACATTTTAAACGGTTTTGATAAAGAAATGTCTGATATCATTGCGAATC	4346
MG1363	AAGGCTTGGACCACATTTTAAACGGTTTTGATAAAGAAATGTCTGATATCATTGCGAATC	4500

AJ01	GTGTGAAATCTGCTGGTCTGAAATCTTACTTCGGCGATGGCTAAATCAGCTACTCAA	4422
SK11	GTGTGAAATCTGCTGGTCTGAAATCTTACTTCGGCGATGGCTAAATCAGCTACTCAA	4406
MG1363	GTGTGAAATCTGCTGGTCTGAAATCTTACATCGGCGATGGCTAAATCAGCTACTCAA	4560

AJ01	CCGATAAGATGTGACTTTAACTTTTGAAGTTGACGGAAGAAACAACAGTAACTGGTG	4482
SK11	CCGATAAGATGTGACTTTAACTTTTGAAGTTGACGGAAGAAACAACAGTAACTGGTG	4466
MG1363	CCGATAAGATGTGACTTTAACTTTTGAAGTTGACGGAAGAAACAACAGTAACTGGTG	4620

AJ01	ATTACTTACTCGTTTCTGTTGGACGTCGTCCAATACTGATTTGATTGGCTTGAACAATA	4542
SK11	ATTACTTACTCGTTTCTGTTGGACGTCGTCCAATACTGATTTGATTGGCTTGAACAATA	4526
MG1363	ATTACTTACTCGTTTCTGTTGGACGTCGTCCAATACTGATTTGATTGGCTTGAACAATA	4680

AJ01	CTGATGTCAAATTGACTGACCGTGGTTTGATTGAAGTTGATGATTCTTATGCAACGAATG	4602
SK11	CTGATGTCAAATTGACTGACCGTGGTTTGATTGAAGTTGATGATTCTTATGCAACGAATG	4586
MG1363	CTGATGTCAAATTGACTGACCGTGGTTTGATTGAAGTTGATGATTCTTATGCAACGAATG	4740

pdhD-forward-1		
AJ01	TTCCTCATATTTACGCGATTGGTGATGTGGTTCCTGGACCAATGCTCGCACACAAAGCTT	4662
SK11	TTCCTCATATTTACGCGATTGGTGATGTGGTTCCTGGACCAATGCTCGCACACAAAGCTT	4646
MG1363	TTCCTCATATTTACGCGATTGGTGATGTGGTTCCTGGACCAATGCTCGCACACAAAGCTT	4800

pdhD-reverse-1		
AJ01	CTTTCAAGCCAAAGTTCTTTCTAAACCAAGGACTTACACGTTGCTTTGCCTG-----	4715
SK11	CTTTCAAGCCAAAGTTGCTGCAGCGGCCATTGCTGGAGCTGAAGATGACGTGGA-----	4701
MG1363	CTTTCAAGCTAAAGTTGCTGCAGCGGCCATTGCTGGAGCTGAAGACGACGTGGACTTGC	4860

図 11 *Lactococcus cremoris* AJ01, *Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris* MG1363 および *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 を用いて行った塩基配列の Multiple alignment 結果
 * : 塩基配列の完全一致

■ : PCR に使用したプライマーの位置

→ではさまれた部分が各酵素の読み枠を示す

E1- α

ASAFATDEDWLFPGYRDLPPQIYAKGWPIWKGLLWSRGHQLGNEYTTDDGKPVNSW
FPQIIIGAQYVEAAGVALGLKKRKKDAVAFVYTGDDGSSQGDYEGINFAGAYKAPLVA
FIQNNGYAISTPRSLQSAAPHLAAKGWAAGAPSIVVDGMDAIAMYLASKEARAWAVAG
NGPVVIEAITNRLEPHSTAGDDPLRYRTKEDIEAWWKKEPLVRMRNFLTEKGLWDTD
KEEAYVAELDARIDADIKKANNVEKQKISSFIKNTLEVPSQAMAEQIAKFESEGNKNGSK
NLYCSNYRSA

E1- β

LKKDFGIQIKKKMLLSLMHVLMLISRKQIMLNKKFQASLKIHLKCQAKQWQNKLQ
NLKARAIMAVKTYIAAITEALDLALEKDKDALIFGEDVGQNGGVFRATDGLQAKYGE
DRVFNTPLAESGIGGMAIGLATQGFHPIMEIQFGTFIFEVFD SIAGQMSRTRYRFNNTR
SNNIVVRTPYGIGTKTPEMHADSIEGLFSQLPGVRVVMPSNPADAKGLLLASIENNDPV
IFLENLHLYRSLKGEVPEGYYTTPLDQAAVAKEGSDVSIIAYGGTVPLALKAAEQLEKDG
IKAEVIDLRTVAPLDIASIGKTVEKTGRVVVVQEAQRTAGIAANVMAEISERFVLNLKAPI
GRVTGPDSIFPFAQAENDWAVKAEDIVNKVKEVVDYD

E2

IKLKRWLIMTEIFKMPDIGEGMHEGDIANWLVKVGDVVKEDDPVIAEVQNDKLMQEIL
SPYSGTVTKLFVEEGTTVEVDSPLVEFDGDASGTSAAAPSAQETASSDAPSGNAQIFTM
PDIGEGMHEGDIANWLVKVGDEIKEDDPVIAEVQNDKLMQEILSPYSGKVTCLFVEAG
TTVEVGAPLIEYNGNGESSNPAPAASPAIAEAHKAAPTDAPLTKTSTGHILAMPS
VRHYARKAGIDLTQVPATGRHGHTTLADVKA FESGSVAPIAPVAPESAPVAPAPKADKA
TEKAPTVKSVAGDRREAMNPTRKVVSKVMTAQHTHIPVTFNFDQVEVSKLVKHRAVF
KEVAAKQDIKLTLYLAYVAKALATTAHKFPEINASVDYDKQEIVYHEHVN LGIAVNAPTG
LYVPVIHEAETKSILEIAKEIVELATATREGTLKPQQMQGSTITISNIGSARGSWFTPIING
SDVVILGLGSIVKEPIVNGEGEIVVGQNMKLSMTYDHRIDGMLGQTSNLKSLLD
PEFMLMEI

E3

KMVVGAQATEVDLVVIGSGPGGYVAAIRAAELGKKVTIIEKDNVGGVCLNIGCIPSKALI
NIGHHYQESLEEEKGENPFGLSVGNVKNLWESAQKWKQDKVVNQLTGGVKMLLKKH
KVDVIQGTAEFIDNNTINVEQEDGFQLLQFNDVIISTGSRPIEPSFPFGGRIIDSTGALS
LPEVPKHLIIVGGGVIGSELGGAYRMLGSKITIVEGLDHILNGFDKEMSDIIANRVKSAG
SEIFTSAMAKSATQTDKDVTLTFEVDGKEQTVTGDYLLVSVGRRPNTDLIGLNNTDVK
LTDRGLIEVDDSYATNVPHIYAIGDVVPGPMLAHKASFQAKVLSKPRTYTLLCL

図 12 AJ01 株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のアミノ酸配列

表3 AJ01株のアルデヒドデヒドロゲナーゼ (AldDH) 活性

NAD ⁺ の還元量 (nmol)	1回目	2回目	3回目	平均
	ND	ND	ND	ND

ND…Not detection

表4 AJ01株の α -ケト酸デカルボキシラーゼ (KADC) 活性 (A) 酵素反応液中の 3-メチル
 ブタナール (nmol), (B) 酵素反応に使用した CFE 中のタンパク質量 (mg/700 μ L), (C) α -
 -ケト酸デカルボキシラーゼ (KADC) 活性 (nmol/mg/分) (D) CFE 中の 3-メチルブタナール
 濃度 (mg/L)

A

3-メチルブタナール (nmol)										平均	標準偏差
無添加	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ロイシン 添加	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

B

タンパク質 (mg)				平均	標準偏差
無添加	0.127	0.0806	0.0290	0.0790	0.0492
ロイシン 添加	0.0744	0.0609	0.0960	0.0771	0.0177

C

KADC活性 (nmol/mg/分)										平均	標準偏差
無添加	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ロイシン 添加	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

D

3-メチルブタナール (mg/L)				平均	標準偏差
無添加	0.229	0.237	0.132	0.199	0.0589
ロイシン 添加	0.354	0.179	0.400	0.311	0.117

ND…Not detection

表5 AJ01株のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 (PDH) 活性 (A) 酵素反応液中の
NAD⁺還元量 (nmol), (B) 酵素反応に使用した CFE 中のタンパク質量 (mg) および (C)
ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 (PDH 活性) (nmol/mg/分)

A

	NAD ⁺ 還元量 (nmol)									平均	標準偏差
無添加	1.93	2.25	2.25	1.77	2.41	2.09	1.61	1.61	1.45	1.93	0.320
ロイシン 添加	2.41	2.41	2.25	1.45	1.77	1.45	2.25	2.57	2.41	2.11	0.409

B

	タンパク質 (mg)									平均	標準偏差
無添加	0.018	0.028	0.029	0.021	0.021	0.023	0.014	0.013	0.014	0.020	0.0057
ロイシン 添加	0.020	0.021	0.032	0.014	0.014	0.021	0.020	0.024	0.028	0.021	0.0057

C

	PDH活性 (nmol/mg/分)									平均	標準偏差
無添加	11.0	7.98	7.76	8.51	11.6	9.13	11.9	12.2	10.6	10.1	1.65
ロイシン 添加	12.1	11.8	6.99	10.7	12.9	6.78	11.3	10.9	8.55	10.2	2.11

ND…Not detection

Table 1 Amount of 10% citric acid solution and rennet added to experimental cottage cheese

	pH6.0	pH5.5	pH5.0	pH4.5
10%citric acid solution (mL/500 mL)	4	9.5	17	27
rennet (soxhlet unit/500 mL)	400	280	125	125

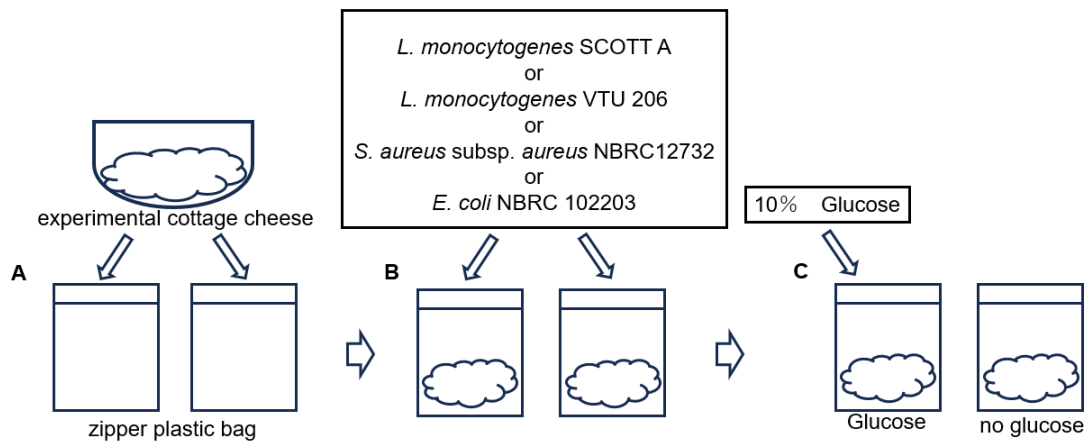


Figure 1 Procedure for cottage cheese production

Experimental cottage cheese was divided into two parts and placed in a zipper plastic bag (A). Both cheeses were inoculated with the test strain (B), and then 10% of the cheese weight of glucose was added to the cheese (C).

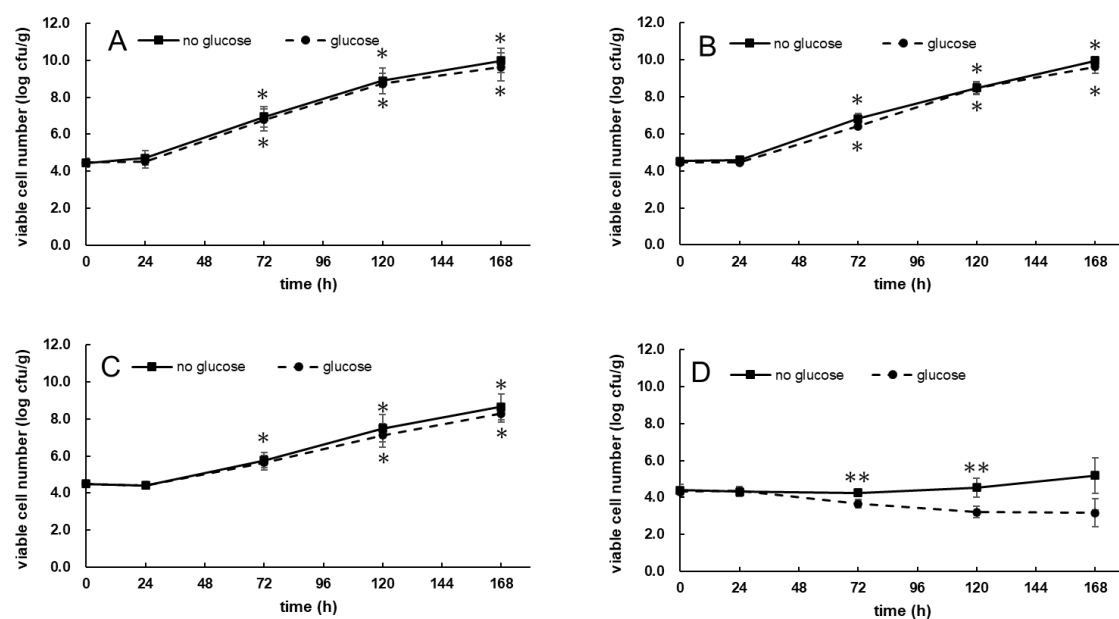


Figure 2 Viable cell number of *Listeria monocytogenes* SCOTT A

A: pH6.0, B: pH5.5, C: pH5.0, D: pH4.5

■: no glucose, ●: glucose

Each value represents the mean \pm S.D. ($N=4$).

* (At the top of the graph) : Significant difference compared to the viable cell number at 0 hours in no glucose ($p < 0.01$).

* (At the bottom of the graph) : Significant difference compared to the viable cell number at 0 hours in glucose ($p < 0.01$).

* * : Significant difference in viable cell number between no glucose and glucose at the same time ($p < 0.01$).

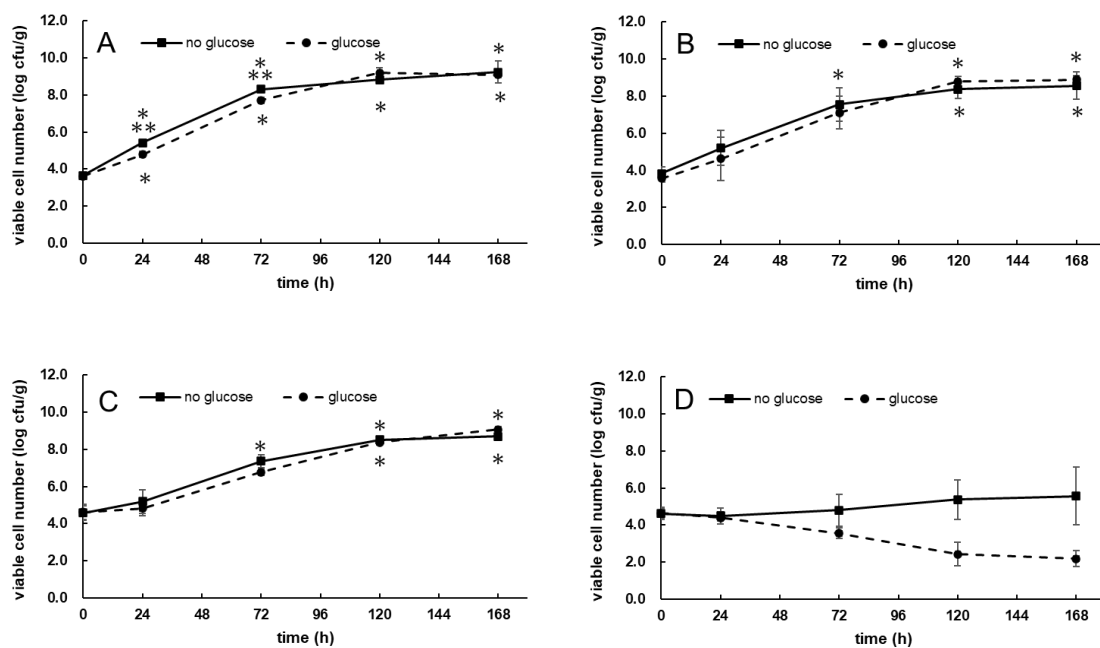


Figure 3 Viable cell number of *Listeria monocytogenes* VTU 206

A: pH6.0, B: pH5.5, C: pH5.0, D: pH4.5

■: no glucose, ●: glucose

Each value represents the mean \pm S.D. ($N=3$).

* (At the top of the graph) : Significant difference compared to the viable cell number at 0 hours in no glucose ($p < 0.01$).

* (At the bottom of the graph) : Significant difference compared to the viable cell number at 0 hours in glucose ($p < 0.01$).

* * : Significant difference in viable cell number between no glucose and glucose at the same time ($p < 0.01$).

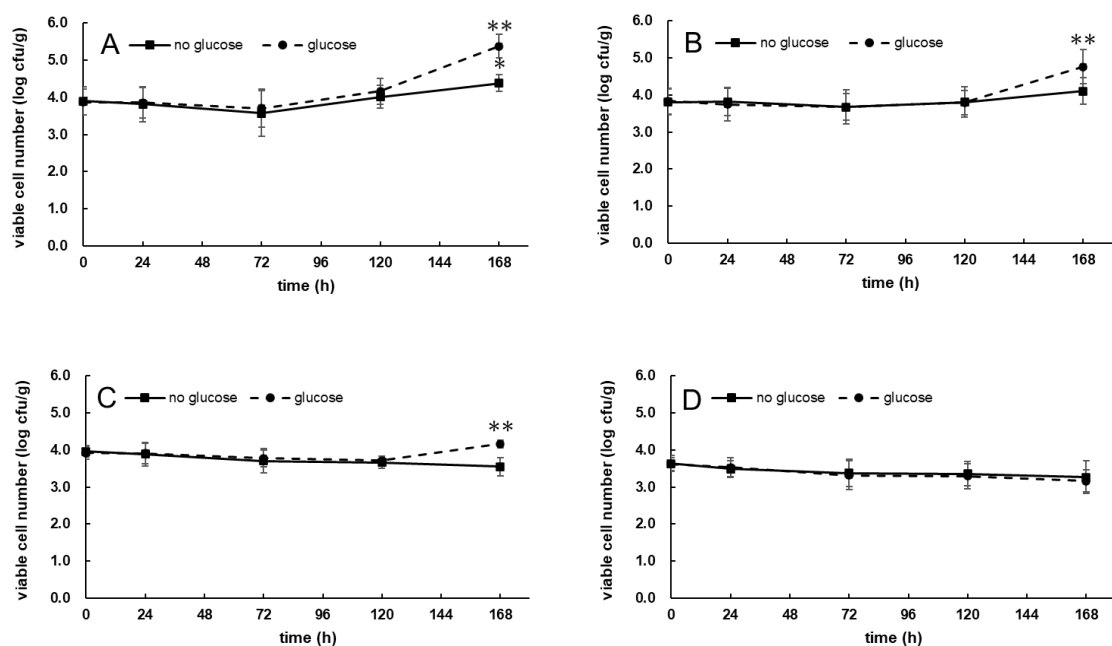


Figure 4 Viable cell number of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NBRC12732

A: pH6.0, B: pH5.5, C: pH5.0, D: pH4.5

■: no glucose, ●: glucose

Each value represents the mean \pm S.D. ($N=4$).

* (At the top of the graph) : Significant difference compared to the viable cell number at 0 hours in no glucose ($p < 0.01$).

* (At the bottom of the graph) : Significant difference compared to the viable cell number at 0 hours in glucose ($p < 0.01$).

* * : Significant difference in viable cell number between no glucose and glucose at the same time ($p < 0.01$).

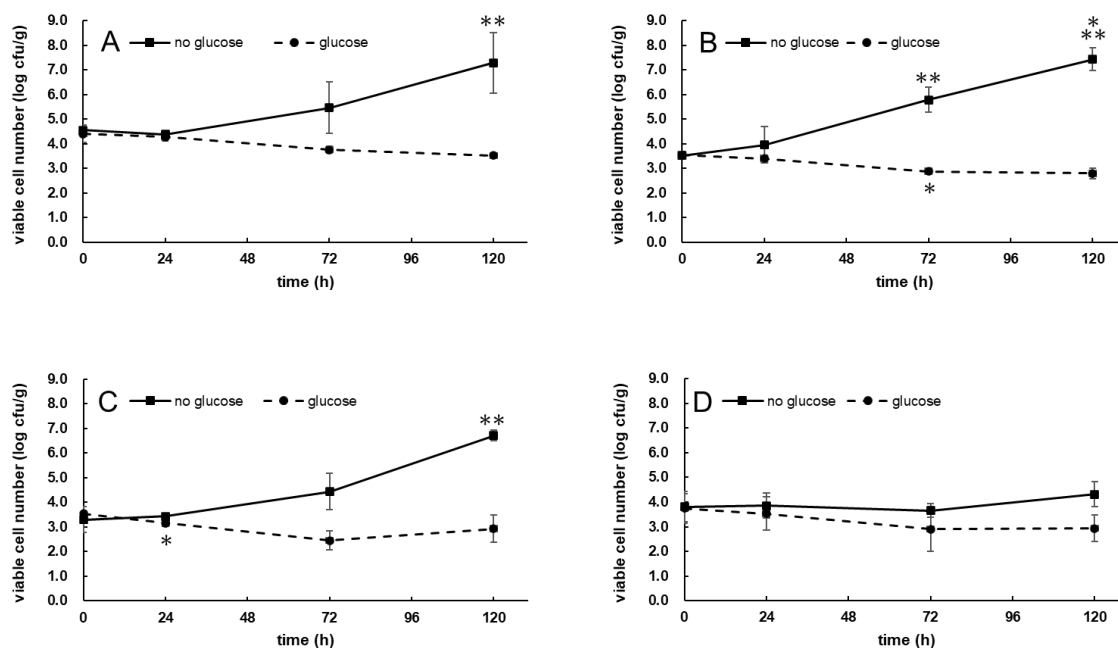


Figure 5 Viable cell number of *Escherichia coli* NBRC102203

A: pH6.0, B: pH5.5, C: pH5.0, D: pH4.5

■: no glucose, ●: glucose

Each value represents the mean \pm S.D. ($N=3$).

* (At the top of the graph) : Significant difference compared to the viable cell number at 0 hours in no glucose ($p < 0.01$).

* (At the bottom of the graph) : Significant difference compared to the viable cell number at 0 hours in glucose ($p < 0.01$).

* * : Significant difference in viable cell number between no glucose and glucose at the same time ($p < 0.01$).